

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

**Análisis de las vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal sincrónico
no hereditario**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José Antonio Pajares Díaz

Directores

**José Perea García
Gerardo Clemente Ricote
Rafael Bañares Cañizares**

Madrid, 2017

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



TESIS DOCTORAL

Análisis de las vías de carcinogénesis del cáncer colorrectal sincrónico no hereditario

Memoria presentada por el Licenciado en Medicina y Cirugía:

José Antonio Pajares Díaz

para optar al grado de

Doctor en Medicina

Directores de Tesis:

Dr. José Perea García

Dr. Gerardo Clemente Ricote

Prof. Rafael Bañares Cañizares

Madrid, 2015

INDICE

ABREVIATURAS	I
RELACIÓN DE TABLAS	VII
RELACIÓN DE FIGURAS	XIII
RESUMEN	XVII
SUMMARY	XXVII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER COLORRECTAL	3
1.2. FISIOPATOLOGIA DEL CÁNCER DE COLON.	5
1.2.1. Secuencia de carcinogénesis	5
1.2.2. Vías de carcinogénesis	8
1.2.3. Clasificación molecular de los CCR	15
1.3. PÓLIPOS COLÓNICOS: Lesiones precursoras del CCR	16
1.3.1. Pólipos adenomatosos.....	16
1.3.2. Pólipos serrados.....	17
1.4. FACTORES ETIOLÓGICOS	19
1.4.1. Cáncer heredofamiliar	19
1.4.2. Cáncer esporádico	26
1.5. CONSIDERACIONES CLÍNICAS	30
1.5.1. Diagnóstico	30
1.5.2. Tratamiento quirúrgico.....	34
1.5.3. Seguimiento	37
1.6. CANCER COLORRECTAL SINCRÓNICO	37
1.6.1. Cáncer de colon múltiple	37

1.6.2.	CCR sincrónico	38
1.6.3.	CCR sincrónico familiar	39
1.6.4.	CCR sincrónico no hereditario	40
1.6.5.	Estudio de las vías de carcinogénesis	40
2.	JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	43
3.	MATERIAL Y METODOS	47
3.1.	PACIENTES.....	49
3.1.1.	Ámbito del estudio	49
3.1.2.	Información recogida.	49
3.2.	MATERIAL.....	51
3.2.1.	Tejido incluido en parafina	51
3.3.	ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO NORMAL.....	55
3.3.1.	Panel de Bethesda	55
3.4.	ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES CpG.	57
3.5.	CONSTRUCCIÓN DE MICROMATRICES DE TEJIDO.	58
3.6.	INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).	59
3.7.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	63
4.	RESULTADOS.....	65
4.1.	ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA	67
4.1.1.	Variables anatómo-clínicas.....	67
4.1.2.	Descripción de las variables anatómo-clínicas en función del patrón de distribución	69
4.2.	ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS.....	71

4.2.1.	Estudio de vía metiladora	71
4.2.2.	Análisis de la inestabilidad de microsatélites	79
4.2.3.	Inestabilidad cromosómica.....	81
4.3.	ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO	81
4.3.1.	Análisis del patrón IHQ y las variables anatómo-clínicas	81
4.3.2.	Comparación de la expresión de los diferentes marcadores IHQ entre los tumores del mismo individuo	83
4.3.3.	Estudio de la expresión de diferentes marcadores en función del patrón de distribución de los tumores.	86
5.	DISCUSIÓN.....	89
6.	CONCLUSIONES	101
7.	BIBLIOGRAFÍA	105

ABREVIATURAS

Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura castellana, en aquellos casos en los que existe, y la inglesa para el resto de los casos. Muchos de los acrónimos corresponden a palabras del inglés.

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AJCC: American Joint Committee on Cancer

APC: del inglés Adenomatous polyposis coli.

ARN: Ácido ribonucleico

ASCO: del inglés American Society of Clinical Oncology

BMPR1A: del inglés Bone morphogenetic protein receptor 1A

BRAF: del inglés B-Raf Proto-Oncogene

C: Citosina

CCHNP: Cáncer Colorectal Hereditario No Polipósico

CCR: Cáncer Colorectal

CIMP: del inglés CpG island methylator phenotype

CIMP-H: del inglés CpG island methylator phenotype high

CIMP-L: del inglés CpG island methylator phenotype low

CK20: Citoqueratina 20

DCC: del inglés Deleted in Colorectal Cancer

DE: Desviación estándar

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EGF: del inglés epidermal growth factor

EGFR: del inglés epidermal growth factor receptor

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

EMS: Estabilidad de microsatélites

FM: Fenotipo metilador

G: Guanina

GDP: Guanosin difosfato

GTP: Guanosin trifosfato

GTPasa: Guanosin trifosfato

IGF-1: del inglés insulin-like growth factor-1

IGFBP: del inglés Insulin-like growth factor-binding protein

IHQ: Inmunohistoquímica

IMS: Inestabilidad de microsatélites

INC: Inestabilidad Cromosómica

LOH: del inglés Loss of Heterozygosity.

M: Molar

MACS: del inglés microsatellite and chromosomal stable sporadic colorrectal cáncer

MAPK: del inglés Mitogen-activated protein kinases

MLH: del inglés MutL-homolog

mg: miligramos

mM: Milimolar.

MMR: mismatch repair

MSH: del inglés MutS Homolog

μl: Microlitro

μm: micrómetros.

n: número de casos.

ng: Nanogramo.

nm: Nanómetro.

n.s: No estadísticamente significativo

PAF: Poliposis Adenomatosa Familiar.

PAFA: Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada.

pb: Pares de bases.

PBS: del inglés Phosphate Buffered Saline.

PH: Poliposis Hereditaria

PJ: Poliposis juvenil

POLD/POLE: del inglés DNA polymerase epsilon gene

PREMM: Prediction Model for MLH1, MSH2, and MSH6 Gene Mutations

PS: Poliposis serrada

rpm: Revoluciones por minuto.

SL: Síndrome de Lynch

SEER: Surveillance, Epidemiology and End Results

SPJ: Síndrome de Peutz-Jeghers

TBE: Tris, ácido bórico y EDTA.

TE: Tris-EDTA.

UV: ultravioleta.

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Wnt: del inglés Wingless type

5-FU: 5-Fluorouracilo

RELACIÓN DE TABLAS

Tabla 1: Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador. Modificado de la Chapelle 2003.	15
Tabla 2: Características de las dos vías principales de generación de pólipos colónicos	18
Tabla 3. Criterios clínicos de Amsterdam y de Bethesda para la sospecha del SL	22
Tabla 4: Sistema de clasificación TNM: Calificación de extensión (T), afectación ganglionar (N) y presencia de metástasis (M).	33
Tabla 5: A la izquierda: clasificación por estadios para el CCR según la clasificación TNM de la AJCC. A la derecha: Tasa de supervivencia a los 5 años (O'Connell, Maggard, and Ko 2004)	34
Tabla 6: Datos anatómo-patológicos. (1)A la hora de definir la localización general, se toma la del tumor con mayor estadio.	50
Tabla 7: Tamaño de los productos de PCR y fluorocromos empleados para el análisis de la IMS mediante el "panel de Bethesda" (HNPCC Microsatellite Instability Test, Roche).	55
Tabla 8: Condiciones de la PCR multiplex	56
Tabla 9: Preparación de la mezcla para la PCR multiplex	56
Tabla 10: Marcadores, clones y casas comerciales de los anticuerpos utilizados en la técnica de IHQ en cortes de tejido incluido en parafina.	60
Tabla 11: Marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular seleccionados para el estudio IHQ en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.	61
Tabla 12: Moléculas implicadas en adhesión celular seleccionadas para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.	61

Tabla 13: Moléculas implicadas en la proliferación celular seleccionadas para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.....	62
Tabla 14: Otros marcadores seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares	62
Tabla 15 características epidemiológicas de la población	67
Tabla 16 Estadio de los tumores de los pacientes según los criterios de la AJCC y la clasificación de Astler-Coller modificada.	68
Tabla 17: Localización de los tumores que definen el estadio y su distribución por segmentos	68
Tabla 18: Patrón de distribución de los tumores de cada individuo respecto al ángulo esplénico.....	69
Tabla 19. Proporción de hombres y mujeres en función del patrón de distribución a lo largo del colon	69
Tabla 20. Edad media de los pacientes en función del patrón de distribución de los tumores.	70
Tabla 21 : Frecuencia de variables anatomo-patológicas y estadio de toda la muestra. n.s.: no estadísticamente significativo	71
Tabla 22 Resumen de las variables anatomo-clínicas más relevantes respecto al nivel de metilación de los tumores sincrónicos.	72
Tabla 23. Desarrollo de tumores metacrónicos en función del patrón de metilación.	73
Tabla 24. Patrón de metilación en tumores sincrónicos $\kappa=0,44$	73
Tabla 25. Patrón de metilación de los tumores en función del patrón de distribución	74
Tabla 26. Concordancia del nivel de metilación de los tumores en función de su patrón de distribución.	74

Tabla 27. Resumen de las variables anatómo-clínicas en función de la metilación individual de los genes del panel de metilación CIMPA	Análisis de la metilación de genes individualmente respecto al patrón de distribución	76
Tabla 28 Patrón de metilación de <i>CKDN2A</i> en tumores sincrónicos en función del patrón de distribución		77
Tabla 29. Patrón de metilación de <i>IGF2</i> respecto al patrón de distribución.....		78
Tabla 30 Patrón de metilación de <i>MLH1</i> , <i>CACNA1G</i> , <i>CRABP1</i> respecto al patrón de distribución de los tumores de CCR ($p>0,05$ para todas las comparaciones.		78
Tabla 31. Patrón de metilación de <i>NEUROG1</i> y <i>RUNX3</i> respecto al patrón de distribución de los tumores de CCR ($p>0,05$ para todas las comparaciones.		79
Tabla 32. Descripción de las características moleculares de los tumores de los pacientes con IMS.....		79
Tabla 33. Porcentaje de pacientes con IMS en función del patrón de distribución....		80
Tabla 34. Desarrollo de pólipos asociados en función de IMS/EMS de los tumores. .		80
Tabla 35 Concordancia del fenotipo de inestabilidad microsatélites y del fenotipo metilador de cada pareja de tumores sincrónicos ($\kappa=0,47$).....		81
Tabla 36. Resumen de las variables anatómo-clínicas en función del patrón IHQ.		83
Tabla 37. Concordancia de la expresión de CK20 en los tumores sincrónicos.....		83
Tabla 38. Expresión de membrana de β -catenina en tumores sincrónicos.		84
Tabla 39. Expresión nuclear de β -catenina en sincrónicos.		84
Tabla 40. Activación de la vía Wnt en tumores sincrónicos.		85
Tabla 41. Concordancia del patrón de expresión del panel de marcadores de IHQ...		85
Tabla 42: Patrón de expresión de p27 nuclear en función del patrón de distribución de los tumores ($p=0,049$).....		86
Tabla 43. Patrón de expresión concordante de los tumores en función del patrón de distribución		87

Tabla 44. Fenotipo de ausencia de expresión de β -catenina en al menos uno de los tumores sincrónicos en función del patrón de localización.....	87
--	----

Tabla 45. Activación de la vía Wnt en al menos uno de los tumores sincrónicos en función del patrón de localización.	88
---	----

RELACIÓN DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad en diferentes áreas geográficas (año 2012)	3
Figura 2 Incidencia específica por edad de CCR entre los años 2002-2006 en hombres y mujeres de todas las razas. Datos de: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2002-2006.....	4
Figura 3: Estimación de la incidencia de CCR por sexos en 2020, considerando la incidencia actual y las características de la población española.....	4
Figura 4: Histología de la mucosa de colon. De American Joint Committee on Cancer (AJCC). Staging Manual.Modificado de: “The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine”. Brown et al Nature Immunology 14, 660–667 (2013).....	5
Figura 5: Capacidades adquiridas en el proceso de carcinogénesis por las células tumorales. Potenciales dianas terapéuticas y fármacos en desarrollo. Adaptada de Hanahan and Weinberg. (Hanahan and Weinberg 2011)	7
Figura 6: Secuencia adenoma-carcinoma. Adaptado de Morán A et al 2010 y Armaghany T et al.2012.....	8
Figura 7: Representación de los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis, así como los correspondientes solapamientos. Modificado de Snover DC, 2011.....	10
Figura 8. Clasificación de Paris: clasificación morfológica de los pólipos de colon.....	17
Figura 9. Secuencia de alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de adenomas serrados sésiles (SSA). Modificado de Leggett and Whitehall, 2010.....	18
Figura 10: Importancia relativa de los diferentes síndromes de CCR heredofamiliar. Extraído de Burt et al, Gastroenterology, Vol. 119, No. 3 (73).....	19
Figura 11: Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde un T0 hasta un T4, en el que hay infiltración prostática.	31

Figura 12: Clasificación modificada de Astler y Coller.....	32
Figura 13: Resultado de la amplificación del ADN normal (A) y de un tumor (B) que muestra IMS en todos los marcadores microsatélites analizados.	57
Figura 14. A) Micromatriz de tejido. Tomado de http://tissuearray.org/yale/tisarray.html. B) Tinción HE de una sección de una de las matrices de tejido incluidas en el estudio.	58
Figura 15. Patrón del nivel de metilación de los tumores en función del sexo de los pacientes (*p=0,05)	72

RESUMEN

Introducción

El cáncer colorrectal (CCR), es la tercera neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. Desde una perspectiva molecular, la formación de un tumor es consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones tanto a nivel genético como epigenético.

La mayoría de los CCR son esporádicos y aparecen como consecuencia de mutaciones a nivel somático. Sin embargo, pueden existir mutaciones a nivel germinal que transmiten la susceptibilidad para el CCR a las generaciones posteriores, produciendo los diferentes síndromes de CCR hereditario.

Se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis en el desarrollo del CCR:

- vía supresora o de inestabilidad cromosómica (INC),
- vía mutadora o de inestabilidad de microsatélites (IMS)
- vía metiladora o del fenotipo metilador de islas de CpG (CIMP).

La vía supresora o de INC es la alteración más frecuente. No sólo se encuentra en la mayor parte de los casos de CCR esporádicos, sino también en síndromes hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (PAF). Este tipo de tumores se caracterizan por el desequilibrio cromosómico (aneuploidía), con deleciones, amplificaciones y una alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH, *Loss of Heterozygosity*). Existen dos tipos de alteraciones:

- la activación de oncogenes, como *K-RAS* y *c-MYC*
- la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral, *APC*, *DCC*, *p53*, *TGFBR* o *PIK3CA*

La vía mutadora o de IMS se caracteriza por la aparición de alteraciones en los genes mismatch repair (MMR). Los genes MMR (*MSH2*, *MLH1*, *PSM1* Y *PSM2*, *MSH6* o *MLH3*), son genes que regulan la corrección de los emparejamientos incorrectos o pequeñas inserciones que se producen en la replicación del ADN. Las mutaciones en

estos genes inducen errores de replicación de ADN, originando lo que se conoce como IMS. El paradigma de esta vía de carcinogénesis es el síndrome de Lynch (SL), aunque también se produce en el 15-30% de los CCR esporádicos.

La vía metiladora se caracteriza por la metilación de regiones ricas en citosina y guanina, denominadas islas CpG. Estas zonas son regiones del ADN que conforman aproximadamente un 40% de los promotores de los genes de mamíferos. Si los genes están expresados, las islas CpG están desmetiladas; la metilación de las islas CpG, provoca un silenciamiento epigenético del gen en cuestión. La vía metiladora se denomina también vía serrada de carcinogénesis colorrectal, ya que surge a partir de una lesión precursora serrada. La metilación de las islas CpG da lugar a lo que se conoce como fenotipo metilador (CIMP, del inglés Cp G island methylator phenotype) que se determina cuantificando la proporción de loci metilados de una selección de los genes más frecuentemente afectados por esta modificación epigenética. Se distinguen tres fenotipos: ausencia de metilación (CIMP-0), metilación baja (CIMP-L) o metilación alta (CIMP-H). Los mecanismos más comunes que originan un CCR surgen a través de esta vía mediante la activación del gen *BRAF*, que supone la inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon y la metilación del promotor de *MLH1*, produciendo los casos de CCR esporádicos con IMS.

El colon presenta una gran extensión de mucosa, con un alto índice de recambio celular, lo que favorece el desarrollo de neoplasias a lo largo de su superficie y a lo largo del tiempo. Se denominan CCR sincrónicos a los tumores que, siendo independientes, se diagnostican al mismo tiempo o en los primeros seis meses después del primer diagnóstico. Se estima que entre el 5-10% de los tumores de colon son múltiples.

Los tumores sincrónicos, normalmente, se originan sobre un sustrato etiológico común, bien genético o ambiental. En este sentido se conocen diferentes entidades que aumentan el riesgo de presentar CCR sincrónico, entre ellas se encuentran los síndromes de CCR heredo familiar y aquellas enfermedades y situaciones que afectan en un determinado tiempo a una superficie extensa de la mucosa colónica,

promoviendo la aparición de varios focos de displasia. Este es el caso de la enfermedad inflamatoria con afectación colónica de larga evolución. Sin embargo, sólo el 10% de los CCR sincrónicos están relacionados con entidades de reconocido riesgo de tumores múltiples. Por tanto, existe poca información acerca de los factores que predisponen a gran mayoría de los CCR sincrónicos.

Justificación y Ojetivos

Como se ha mencionado anteriormente, los CCR sincrónicos comparten el mismo sustrato germinal y, a priori, la misma susceptibilidad a agentes externos. Sin embargo, existen otros factores a nivel embriológico y fisiológico que pueden modular la susceptibilidad de los diferentes segmentos del colon a sustancias carcinogénicas, capaces de modificar el patrón molecular y por tanto las características del tumor.

Teniendo en cuenta estas consideraciones se planteó la siguiente hipótesis:

“Los tumores sincrónicos de colon, no relacionados con factores hereditarios, comparten las mismas vías de carcinogénesis”

Para validar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificar las características anatomo-clínicas de los pacientes con CCR sincrónico no hereditario y sus diferencias respecto al patrón de distribución.
2. Caracterizar los tumores sincrónicos de cada individuo según la clasificación molecular, atendiendo a su estado de IMS y fenotipo CIMP.
3. Analizar la concordancia de las características moleculares de los diferentes tumores del mismo individuo y su variación en función del patrón de distribución.
4. Caracterizar el patrón de expresión de diferentes marcadores celulares, analizando su correlación tanto entre tumores, como con los diferentes patrones de distribución.

Resultados

En el presente estudio se han analizado las características anatomo-clínicas y moleculares de una serie de 50 pacientes con CCR sincrónico, en los que se ha descartado como factor etiológico los síndromes heredo-familiares conocidos. Se ha valorado la IMS, el fenotipo de metilación CIMP y el patrón inmuno-histoquímico de varios marcadores, analizándose posteriormente la concordancia de estos parámetros entre los tumores de cada individuo. De forma paralela, se ha estudiado si existen variaciones de las características moleculares de los tumores, en función del patrón de distribución:

- **Patrón de distribución en colon derecho (PD-CD):** todos los tumores se localizan proximales al ángulo esplénico.
- **Patrón de distribución en colon izquierdo (PD-CI):** todos los tumores se localizan distales al ángulo esplénico.
- **Patrón de distribución difuso (PD-D):** existen tumores tanto a nivel proximal como distal al ángulo esplénico.

La edad media de los pacientes estudiados fue de 71,24 ($\pm 9,8$) años. Se identificaron un total de 125 tumores cuya localización más frecuente, considerada de forma individual, fue recto seguida de colon derecho.

Los pacientes con tumores con PD-CD presentaron menor frecuencia de pólipos adenomatosos sin embargo, cuando existían, eran de tipo hiperplásico y productores de mucina.

Se realizó el estudio del fenotipo metilador (CIMP) en 49 de los 50 pacientes observando que el 97,9% de los pacientes presentaban cierto grado de metilación en, al menos, uno de sus tumores. De ellos, el 65,3% de los pacientes tenían un estado de metilación alto (CIMP-H) siendo en su mayoría hombres.

El 50% tumores sincrónicos no hereditarios presentaron un fenotipo CIMP-H significativamente mayor de lo descrito en las series de CCR esporádico.

Aproximadamente un tercio de los pacientes (34,7%) presentaban un patrón de metilación (CIMP-H-CIMP-H), el 30,6% de los pacientes presentaban un patrón (CIMP-H, CIMP-0/L), mientras que el 34,7% presentaban (CIMP-0/L,CIMP-0/L).

Los resultados indicaron que el fenotipo CIMP-H-CIMP-H se asociaba directamente con una mayor afectación linfática ($p=0,054$) y de manera inversa con el grado de diferenciación tumoral.

En este trabajo se han identificado algunos genes, dentro del panel de metilación CIMP, que se asocian a variables con significado pronóstico del CCR sincrónico:

- **El patrón de metilación (+/+) para el gen *ACNA1G*** se asoció a con mayor afectación ganglionar, mayor persistencia de la enfermedad y muerte relacionada con CCR
- **La metilación del gen *MLH1* en alguno de los tumores** se asoció con CCR con bajo grado de diferenciación.
- **El patrón de metilación (+/+) para el gen *SOCS1*** se asoció a mayor presencia de metástasis en el momento del diagnóstico.

Otros genes del panel CIMP tienen patrones de metilación que se asociaron a tumores con distribuciones características:

- La metilación del **gen *CKDN2A* en al menos uno de los tumores** se asoció a un patrón de distribución segmentario.
- Los pacientes que presentaban **tumores con PD-D**, presentaron **mayor concordancia, a nivel de metilación del gen *IGF2***, que los pacientes con tumores con distribución segmentaria.

En cuanto al estudio de inestabilidad de microsatélites, la frecuencia de IMS fue menor a la esperada, ya que tan sólo tres pacientes presentaron algún tumor con IMS. Ningún tumor con IMS presentó CIMP-H, mostrándose esta vía como excluyente. Los pacientes con IMS presentaron menor frecuencia de pólipos colónicos, no asociando ninguno de los pacientes pólipos hiperplásicos.

El grado de concordancia del fenotipo metilador entre los tumores sincrónicos, fue moderado; siendo mayor cuando la distribución era PD-D. La mayoría de los tumores sincrónicos, presentaron concordancia moderada en el patrón molecular de las diferentes vías de carcinogénesis, (combinaciones de IMS, EMS y CIMP-H, CIMP-0/L) ($\kappa=0,47$).

La expresión de algunos marcadores inmuno-histoquímicos se relacionó con características de significado pronóstico. Así por ejemplo, el patrón de expresión discordante (-/+) de β -catenina, se asoció con un mayor desarrollo de metástasis. La expresión de p16, en al menos uno de los tumores, se relacionó con diagnóstico en mayores estadios tumorales y la expresión de p27, en al menos uno de los tumores, con mayor grado de diferenciación.

La expresión de β -catenina nuclear y la activación de la vía Wnt, tuvo una concordancia moderada en los dos tumores sincrónicos de cada uno de los pacientes. Los marcadores E-caderina, p27 citoplasmático, p53 y p21 mostraron un patrón discordante de expresión en los tumores de cada individuo.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, presenta diferencias anatómicas específicas en función de su patrón de distribución; siendo características de los tumores localizados en colon derecho, una menor frecuencia de pólipos asociados y una mayor producción de mucina.
2. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario se presenta, mayoritariamente, con patrón de distribución difuso o con patrón de distribución en colon izquierdo.

3. En el cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, el patrón de distribución en colon derecho presenta características moleculares específicas: una menor concordancia del fenotipo CIMP y una mayor frecuencia de tumores con inestabilidad de microsatelites.
4. Atendiendo a la clasificación molecular global, por criterios de CIMP y de IMS, los tumores sincrónicos no hereditarios presentan un nivel de concordancia moderado.
5. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, presenta fenotipo metilador alto con elevada frecuencia, siendo excepcional la inestabilidad de microsatelites como via de carcinogénesis.
6. El patrón de metilación de los genes CKDN2A, IGF2 y SOCS1 en los tumores sincrónicos muestra diferencias en función de que la distribución sea segmentaria o difusa.
7. Diferencias en el patrón de expresión de las proteínas p16, p27 y β -catenina se asocian a variables con significado pronóstico.
8. La expresión a nivel nuclear, de β -catenina y, por tanto, de la activación de la vía de señalización Wnt, presenta una concordancia moderada entre los tumores de cada individuo, siendo más frecuente su participación en el proceso de carcinogénesis de los tumores con patrón de distribución en colon izquierdo.

SUMMARY

Colorectal Cancer (CRC) is the third **most common malignant neoplasm** worldwide and the second leading cause of cancer deaths in developed countries. From a molecular perspective, the formation of a tumor is the consequence of combined genetic and epigenetic changes to the DNA sequence.

The majority of CRC cases are sporadic and appear as a consequence of somatic mutation. However, there may exist germline mutations in pivotal genes underlying the inherited forms of CRC and producing the different CRC hereditary syndromes.

Three main carcinogenic pathways have been implicated in the development of CRC:

- Chromosomal instability (CIN)
- Microsatellite instability (MSI)
- CpG island methylator phenotype (CIMP)

CIN is the most common pathway in sporadic CRC (80-85%) including in CRC hereditary syndromes such as Familial Adenomatous Polyposis (FAP). CIN tumors are characterized by chromosome abnormalities (aneuploidy), with deletions, amplifications, loss of heterozygosity (LOH), homozygous deletions, translocations, and inversions. These tumors are associated to two types of abnormalities:

- Transcriptional activation of oncogenes such as K-ras and c-MYC.
- The **inactivation of tumor suppressor genes** such as APC, DCC, p53, TGFBR and PIK3CA.

A defective DNA mismatch repair (MMR) system is the cause of microsatellite instability (MSI) pathway. The genes (MSH2, MLH1, PSM1 Y PSM2, MSH6 o MLH3) regulate the repair of DNA replication errors such as base mismatches, insertions and deletions. Mutations in these genes can induce errors in DNA replication that lead to Lynch syndrome (LS), but are also produced in 15-30% of sporadic CRC.

The DNA methylation pathway or serrated pathway play an important role in carcinogenesis development. CpG islands are DNA regions within the genome rich in CpG (Cytosine-phosphate-guanine) dinucleotides. CpG islands make up approximately

40% of gene promoters in mammals. The CpG sites are unmethylated in expressed genes, hence CpG island methylation in gene promoters may inhibit gene expression and result in gene inactivation. Serrated pathway has been seen to play a leading role in 35% of CRCs. CIMP patterns have been classified as: **CIMP-high (CIMP-H)**, CIMP-low (CIMP-L) and methylator phenotype-negative (**CIMP-0**). Most CRCs emerging from this pathway; the mechanism seems to be initiated by a mutation that activates gene *BRAF*, which results in an inhibition of physiological apoptosis in colonic epithelial cells. MLH1 promoter methylation, most common in such cases, results in sporadic CRCs with MSI.

The gastrointestinal tract has a high cell turnover rate which favors the development of neoplasm along its surface and over time. Synchronous CRC is defined as multiple (2 or more) distinct tumors that were diagnosed within 6 months of the date of index CRC diagnosis. It is estimated that 5-10% of the tumors are synchronous CRC.

Synchronous CRC normally originate from a shared etiological substrate, be it genetic or environmental. Inherited CRC syndrome, polyposis and diseases that affect colonic mucosa are several factors that increase the risk of synchronous CRC. However, only 10% of synchronous CRC are related these entities. Therefore, there is little information about the factors that predispose the vast majority of synchronous CRC.

HYPOTESIS

As mentioned above, synchronous CRC share the same germinal substrate and the susceptibility to external agents. However there are embryological and physiological factors that modulate the susceptibility to carcinogenic substances of different segments of the colon. These substances are able to modify molecular pattern and therefore the characteristics of the tumor.

Given these considerations, the following hypothesis was proposed:

"Sporadic synchronous colorectal cancer shares the same pathways of carcinogenesis"

To test this hypothesis the following objectives were proposed:

1. Identify the anatomical and clinical characteristics of patients with sporadic synchronous CCR and its differences with respect to the distribution pattern.
2. Characterizing synchronous tumors of each patient according to molecular features such as MSI and CIMP phenotype
3. To analyze the concordance of molecular features of synchronous tumors and its variation based on their distribution pattern
4. To characterize expression pattern of different cellular markers in synchronous tumors, analyzing both the correlation between tumors and their variation in different distribution patterns.

RESULTS

In this study the anatomo-clinical and molecular features have been analyzed in 50 patients with sporadic synchronous CRC, where known hereditary syndrome etiological factors have been ruled out. Concordance of MSI, CIMP phenotype and immunohistochemical pattern have been subsequently analyzed in individual synchronous tumors. In parallel it has been studied whether there are variations in the molecular features of tumors depending on the distribution patterns:

- Right colon pattern (RCP): All tumors are located proximal to the splenic flexure
- Left colon pattern (LCP): All tumors are located distal to the splenic flexure.
- Diffuse pattern (DP): there are tumors in both proximally and distally to the splenic flexure.

The average age of the patients was 71.24 (\pm 9.8) years, with a higher percentage of males (66% vs 34% for women). The studies a total of 125 tumors from 50 patients. The most frequent location of tumors, considered individually, was rectum and right colon.

Tumors with RCP show less frequency of adenomatous polyps, however when present were hyperplastic and mucin-producing.

CpG island methylator phenotype (CIMP) was performed on 49 of the 50 patients noting that 97.9% of patients had at least one tumor with a certain degree of methylation. Of these, 65.3% of patients had CIMP-H, the majority being male.

50% of sporadic synchronous tumors exhibit CIMP-H phenotype. Approximately one third of patients (34.7%) the methylation pattern was CIMP-H-CIMP-H, 30.6% of the patients presented CIMP-H, CIMP-0 /L while 34.7% CIMP-0 / L, CIMP-0 / L.

Results indicate that the phenotype CIMP-H-CIMP-H directly correlates with lymphatic affectation ($p = 0.054$) and inversely with the degree of differentiation of the tumors.

This study identifies several **genes**, included in **CIMP panel**, that have been associated with prognostic variables of synchronous CRC:

- (+/+) ACNA1G methylation pattern is associated with lymph node affectation, greater persistence of disease and death associated with CRC
- MLH1 methylation in any of CRC is associated with tumors with well **differentiated cancer cells**
- (+/+) SOCS1 methylation pattern is associated with increased incidence of metastases at time of diagnosis

Methylation pattern of specific genes included in CIMP panel that are associated with tumor distribution pattern characteristics:

- *CKDN2A* methylation in at least one of the tumors was associated with a segmental distribution pattern
- Tumors with RCP showed concordance to IGF2 methylation.

About the study of microsatellite instability, the frequency of MSI was lower than expected, since only three patients had at least one tumor with MSI. No tumor with MSI showed CIMP-H, showing this way as exclusive pathway. **Patients with MSI** had lower frequency of colonic polyps. None of the patients had any hyperplastic polyps.

There was a moderate **concordance** between **methylation phenotype** of synchronous tumors; the concordance is higher in tumors CRC. Most synchronous tumors showed moderate agreement in the molecular pathways of carcinogenesis (MSI, MSS and CIMP-H, CIMP-0 / L) ($\kappa = 0.47$).

The expression of some **Immunohistochemical (IHC) markers** is related to **clinical prognostic variables**. For example discordant expression pattern of β -catenin (-/+) is associated with further development of metastasis. Expression of p16 in at least one of the tumors is related to **tumors' stage at the time of diagnosis** while p27 expression in at least one of the tumors is related with higher degree of differentiation.

Nuclear expression of β -catenin and Wnt pathway activation, had a moderate concordance between synchronous tumors. Expression of E-cadherin in cytoplasm and p27, p53 and p21 expression showed a discordant expression pattern in synchronous tumors.

CONCLUSIONS

Considering the above results the following conclusions were drawn:

1. Sporadic synchronous colorectal cancers exhibit anatomical and clinical differences based on distribution pattern; tumors with right colon pattern have a lower frequency of polyps and less mucine production.
2. Sporadic synchronous colorectal cancers are mainly presented with diffuse or left colon pattern.
3. Sporadic synchronous colorectal cancers with right colon pattern show specific characteristics including less **concordance between CIMP phenotype**, and a high incidence of tumors with MSI.
4. According to CIMP and MSI global molecular classification status, sporadic synchronous colorectal cancers present a moderate concordance.
5. Sporadic synchronous colorectal cancers have CIMP-H phenotype in high frequency remain exceptional MSI phenotype.
6. CKDN2A and IGF2 methylation pattern show differences depending on distribution pattern of tumors (segmental pattern vs. diffuse pattern).
7. Differences p16, p27 and β -catenin expression pattern are associated to variables with prognostic significance.
8. Nuclear expression level of β -catenin and therefore Wnt signaling pathway activation has a moderate concordance between synchronous tumors of each individual, having a more frequent participation in right colon pattern carcinogenesis.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR), es la tercera neoplasia más común y la segunda causa de mortalidad por cáncer en los países desarrollados. Su incidencia no es homogénea, oscila entre los 0,5 casos/100000 habitantes año en la India hasta los 51,3 casos/100000 habitantes año en Nueva Zelanda.

Estas diferencias se pueden atribuir tanto a factores ambientales como culturales en el seno de una susceptibilidad genética. Cuando comparamos con otros países europeos, la incidencia y la mortalidad en España ocupa una posición intermedia (48). El riesgo acumulado de CCR en la población general es de un 2-6%, siendo mayor cuando existe historia familiar de CCR (156).

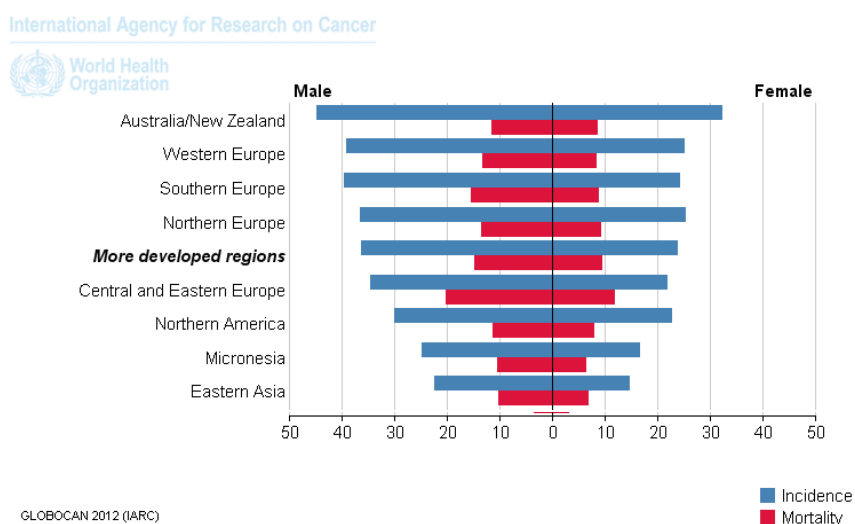


Figura 1. Incidencia y mortalidad en diferentes áreas geográficas (año 2012)

La evolución de la incidencia del CCR, tras un periodo de incremento, comienza a estabilizarse, lo que sucede también con la mortalidad (113). El progresivo envejecimiento de la población influye de forma muy marcada en el incremento del número de casos observados (167). Los datos de “Surveillance, Epidemiology and End Results” (SEER) de Estados Unidos y de otros registros de cáncer occidentales, sugieren

que la tasa de incidencia está aumentando en el grupo de edad entre 40-44 años, mientras que está disminuyendo en los grupos de mayor edad(36) (Figura 2).

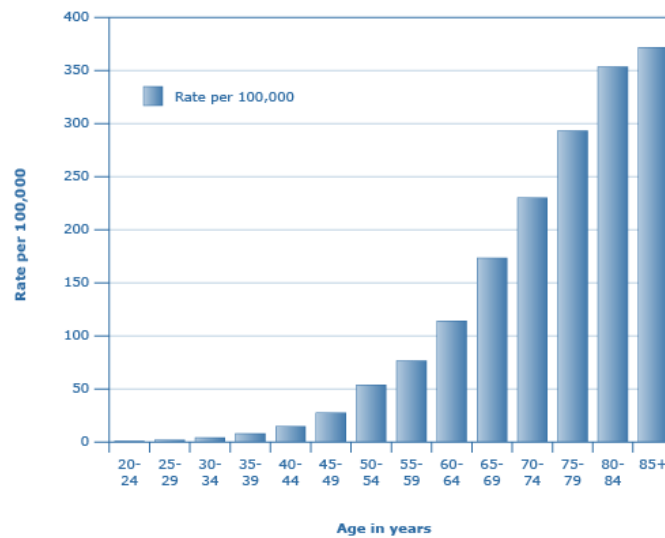


Figura 2 Incidencia específica por edad de CCR entre los años 2002-2006 en hombres y mujeres de todas las razas. Datos de: Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program, 2002-2006.

Se considera que en España, la incidencia de CCR seguirá aumentando en los próximos años, alcanzando en 2020 más de 22426 casos en hombre y 14803 en mujeres (48) como se observa en la Figura 3.

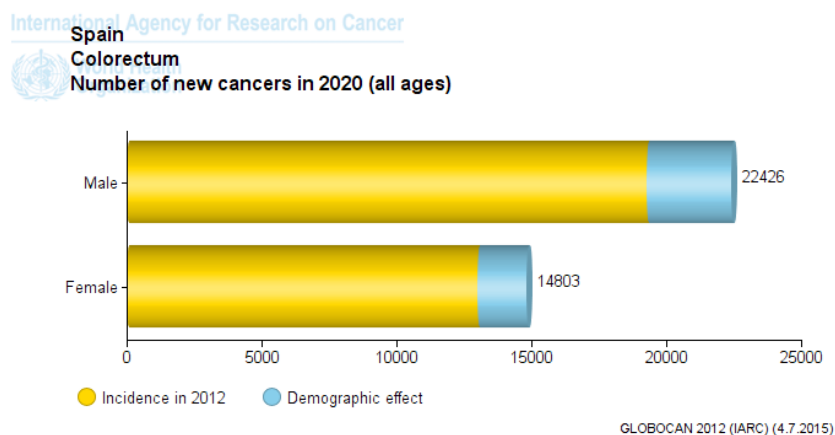


Figura 3: Estimación de la incidencia de CCR por sexos en 2020, considerando la incidencia actual y las características de la población española.

Por lo tanto, parece claro que el CCR seguirá siendo un tumor de gran impacto en la población, a pesar de que tanto la tasa de incidencia como la de mortalidad tienden

hacia el descenso. El aumento de la supervivencia observada, se debe fundamentalmente a dos factores. En primer lugar, gracias a una mejor prevención, utilizando técnicas de diagnóstico precoz más fiables e identificando a los grupos de mayor riesgo y en segundo lugar a la mejora de las estrategias terapéuticas.

1.2. FISIOPATOLOGIA DEL CÁNCER DE COLON.

1.2.1. Secuencia de carcinogénesis

Estructura normal del colon

El intestino grueso o colon, se extiende desde el ciego hasta el ano. Su longitud es de aproximadamente 150 cm y se divide clásicamente en los siguientes segmentos: ciego, colon ascendente, transverso, descendente, sigma y recto.

La mucosa está revestida de células mucosecretoras y células cilíndricas con microvellosidades en su polo apical. En las criptas de las glándulas de Lieberkühn se disponen abundantes células caliciformes, argentafines e indiferenciadas o células madre(95)(186)(22).

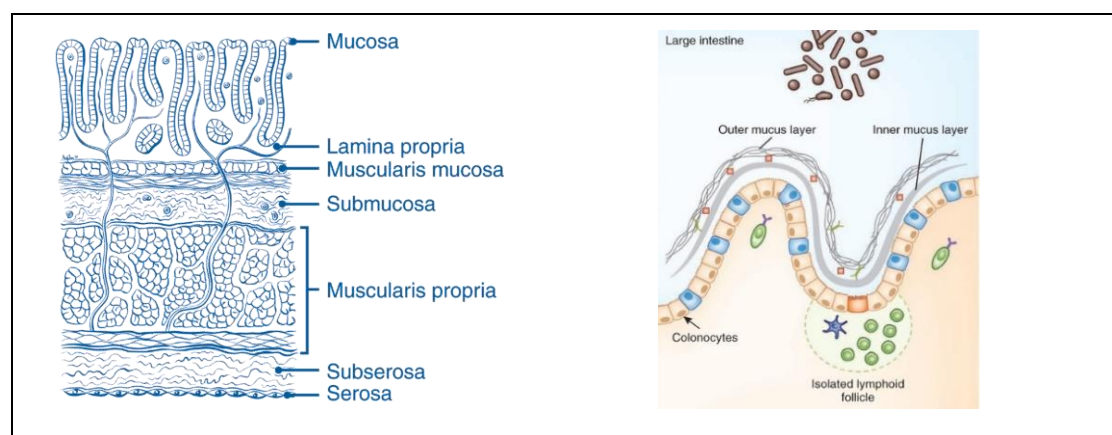


Figura 4: Histología de la mucosa de colon. De American Joint Committee on Cancer (AJCC). Staging Manual. Modificado de: "The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine". Brown et al Nature Immunology 14, 660–667 (2013)

Las células madre o progenitores de las criptas se dividen a un ritmo muy alto, llegando a generar hasta 200 células al día. Al poseer un fenotipo indiferenciado, son capaces

de producir de forma continuada todas las estirpes celulares, así como mantener la capacidad de regeneración del intestino ante una lesión.

Carcinoma invasivo:

El cáncer se caracteriza por la proliferación excesiva y descontrolada de un grupo de células, dando lugar a un tumor o neoplasia. Estas células presentan la capacidad de invadir los tejidos adyacentes así como de migrar a otros órganos y proliferar produciendo metástasis.

En el concepto de carcinoma subyace la capacidad, de algunos clones, de proliferar e invadir otras estructuras adyacentes. La producción de proteasas favorece que el tumor traspase la membrana basal, de forma que las células epiteliales entran en contacto con la matriz extracelular mesenquimal, por ello, el clon debe modificar su patrón de interacción para asegurar la supervivencia (187). Las alteraciones mejor caracterizadas son las relacionadas con las moléculas de adhesión intercelular como E-cadherina. Las uniones intercelulares a través de la E-cadherina permiten a las células el crecimiento en láminas, manteniendo de manera quiescente a esas células. Las células que traspasan la membrana basal, dejan de formar parte de las láminas celulares del epitelio. En esta situación se conforman como células individuales, con atributos de células mesenquimales y con mayor capacidad de migración en invasión. En éste momento, se produce la interacción de la célula tumoral con otras estirpes celulares como los adipocitos, fibroblastos, células madre mesenquimales y macrófagos, que liberan citoquinas y otros mediadores, dando lugar a un microambiente tumoral que influye en las características y el comportamiento de la neoplasia (66).

Intravasación, supervivencia y migración vascular

El siguiente paso en la progresión del tumor es la intravasación, proceso por el cual las células se introducen en la luz de los vasos sanguíneos y linfáticos. Supone un factor pronóstico importante en la progresión de la enfermedad y está favorecida por

diferentes factores como el crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Una vez que la célula tumoral alcanza la circulación, tiene que presentar capacidad de sobrevivir en ese ambiente. Se sabe además que la expresión del receptor tirosin kinasa, TrkB, impide la apoptosis por anoikis (64)(40).

Colonización del tejido diana.

Una vez alcanzado el órgano diana, las células tumorales se deben adaptar a las condiciones del nuevo estroma, que pueden ser muy diferentes al órgano de origen. De nuevo es de gran importancia el fenotipo de transición mesenquimal que haya desarrollado la estirpe tumoral y la interacción con el nuevo microambiente, los factores de crecimiento e interleukinas. Estos pequeños nichos de células tumorales son denominados micrometástasis. No siempre las células consiguen progresar en el ambiente y no llegan a desarrollar metástasis macroscópicas (66). Para desarrollar una macrometastasis puede ser necesario que las células tumorales adquieran nuevas capacidades que les permitan mantener un crecimiento vigoroso. Entre ellas se encuentran la capacidad de inducir angiogénesis y de eludir la respuesta inmune o modificar el metabolismo energético celular, como se esquematiza en la Figura 5.



Figura 5: Capacidades adquiridas en el proceso de carcinogénesis por las células tumorales. Potenciales dianas terapéuticas y fármacos en desarrollo. Adaptada de Hanahan and Weinberg. (Hanahan and Weinberg 2011)

1.2.2. Vías de carcinogénesis

El mecanismo por el que las células adquieren un comportamiento invasivo se denomina carcinogénesis. Es la consecuencia de alteraciones en la codificación y expresión de genes implicados en los sistemas de proliferación y diferenciación celular. Como se ha indicado anteriormente, son especialmente trascendentes las alteraciones de los genes implicados en la regulación de las uniones intercelulares, la capacidad de migración y supervivencia celular, así como la capacidad de inducir la angiogénesis.

El modelo clásico de secuencia “adenoma-carcinoma” (Figura 6) supone la acumulación de alteraciones genéticas sobre el clon tumoral inicial, promoviendo la emergencia de nuevos subclones celulares, con nuevas capacidades y un fenotipo más agresivo.

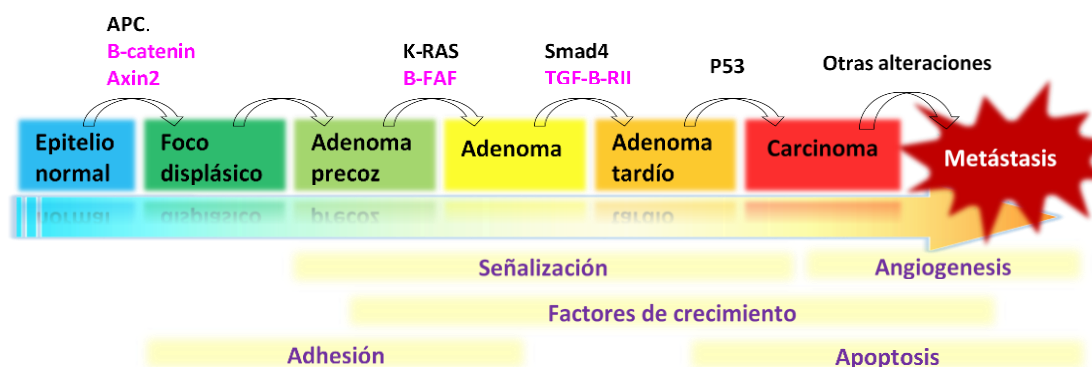


Figura 6: Secuencia adenoma-carcinoma. Adaptado de Morán A et al 2010 y Armaghany T et al.2012

Desde una perspectiva molecular, la formación de un tumor es consecuencia de la acumulación de múltiples alteraciones (1) tanto a nivel genético como epigenético. Las alteraciones genéticas se producen a nivel de la secuencia de ADN, e implican mutaciones, deleciones, amplificaciones e incluso pérdidas o ganancias de cromosomas enteros. Los cambios epigenéticos sin embargo no afectan a la secuencia de los propios genes, sino a la expresión de los mismos. Son múltiples los mecanismos epigenéticos de la regulación de la expresión genética, como por ejemplo la metilación del ADN, la modificación de histonas o el ARN no codificante. La metilación es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados en el CCR, siendo muy

relevante en el silenciamiento de genes debido a hipermetilación de las islas CpG localizadas en sus promotores, como en caso de *MLH1* o *BRAF* (176).

La mayoría de los cánceres son esporádicos, como consecuencia de mutaciones a nivel somático, sin embargo pueden existir mutaciones a nivel germinal, que transmiten la susceptibilidad para el CCR a las generaciones posteriores, produciendo los diferentes síndromes de CCR hereditario(179).

Más allá de las mutaciones clásicas de oncogenes y de genes supresores de tumores, cada vez se le da más importancia a una pléyade de mutaciones y polimorfismos de genes implicados en la carcinogénesis. Estas mutaciones de forma individual, afectan a un escaso número de pacientes, pero de forma global pueden presentar una gran importancia para entender el proceso de carcinogénesis y la historia natural de cada tumor(155)(197).

La carcinogénesis es por tanto un proceso complejo, que da lugar a una gran heterogeneidad y por tanto, una gran variabilidad morfológica y evolutiva en cada tumor (29)(51).

El mayor conocimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis tiene importantes implicaciones tanto en el pronóstico como en el tratamiento del cáncer(195). El CCR, es uno de los tumores más estudiados desde el punto de vista genético. La inestabilidad genética de la mucosa colorrectal facilita el desarrollo de hiperplasia, adenoma, carcinoma *in situ* y, finalmente, carcinoma invasor (Figura 6). Desde que en 1990, Fearon y Vogelstein formularon el primer modelo de carcinogénesis (46), se han identificado tres grandes vías de carcinogénesis en el desarrollo del CCR:

- la vía supresora o de la inestabilidad cromosómica (INC)
- la vía mutadora o de la inestabilidad de microsatélites (IMS)
- la vía metiladora o del Fenotipo Metilador de islas de CpG

Cada una de ellas muestra diferencias desde el punto de vista molecular, histopatológico y pronóstico. Sin embargo estas tres vías no son mutuamente excluyentes (1); puede haber solapamiento de las diferentes vías de carcinogénesis de manera que el CCR no se conforme de una manera única y, aunque haya una secuencia preferente, lo relevante es la acumulación de eventos genéticos que darán el fenotipo final del tumor (58)(176) (Figura 7). El mecanismo dominante será el que determine diferentes asociaciones clínicas, e incluso el tipo de lesión precursora.

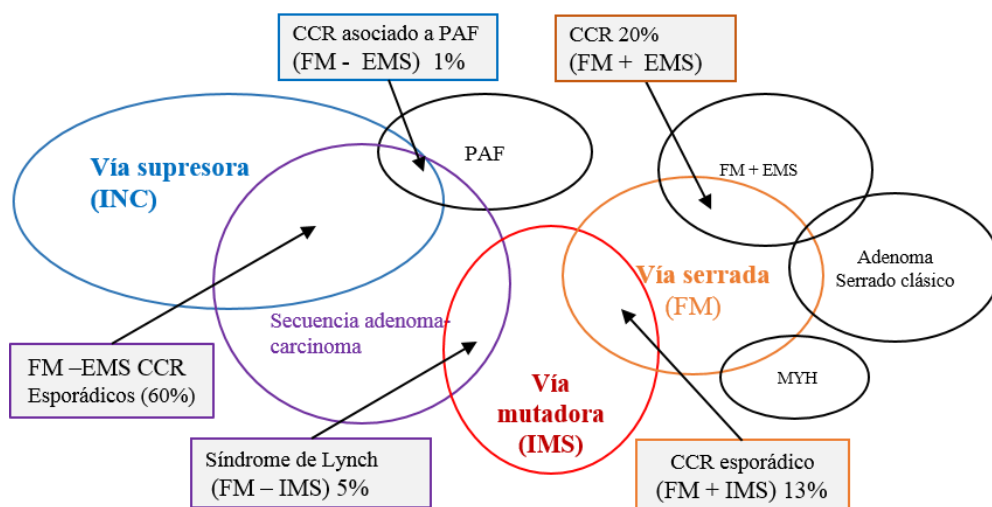


Figura 7: Representación de los diferentes grupos de CCR según las distintas vías de carcinogénesis, así como los correspondientes solapamientos. Modificado de Snover DC, 2011.

La inestabilidad cromosómica (INC)

La INC es la alteración más frecuente. Se encuentra en la mayor parte de los casos de CCR esporádicos (80-85%), pero también en síndromes hereditarios como la Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) con mutaciones a nivel germinal del gen *APC*. Este tipo de tumores se caracterizan por el desequilibrio cromosómico (aneuploidía), con deleciones, amplificaciones y una alta frecuencia de pérdida de heterocigosidad (LOH). En ellos se produce una progresión predecible de cambios genéticos, con los correspondientes cambios histológicos(3).

Diferentes mutaciones genéticas se han relacionado con la carcinogénesis del CCR, pero la función exacta de muchos de estos genes en la iniciación y la progresión de la enfermedad aún no se ha confirmado. Existen dos tipos de alteraciones:

- la activación de oncogenes, como *K-RAS* y *c-MYC*
- la inactivación de genes supresores del crecimiento tumoral como *APC*, *DCC* y *p53* (129)(1).

APC está mutado en el 70-80% de los CCR, la mayoría son mutaciones sin sentido (125) y están presentes en los focos de displasia críptica y en los pólipos de pequeño tamaño en la PAF por lo que parece ser un evento precoz en la secuencia carcinogénica (178)(98). *APC* está implicado en la vía de señalización intracelular denominada wingless (Wnt), forma un complejo con la proteína β -catenina, estimulando la degradación de la misma. La mutación de *APC* hace que haya mayor disponibilidad de β -catenina, promoviendo la proliferación celular a través de la proteína Tcf-4. Se ha observado que la mayoría de los CCR esporádicos, que no presentan mutaciones de *APC*, presentan mutaciones de la β -catenina, iniciando del mismo modo, la cascada de alteraciones de la vía Wnt(201).

Los oncogenes *RAS* codifican para la síntesis de proteínas con homología a las proteínas G, que regulan la transmisión de las señales de crecimiento desde el medio extracelular hasta el núcleo, cuando se encuentran trifosforiladas (GTP-proteína)(128). Esta vía de señalización se regula mediante la hidrólisis de la GTP-proteína a GDP proteína por una GTPasa. La mayoría de las mutaciones de *RAS* relacionadas con la carcinogénesis, provocan la resistencia de la proteína a la hidrólisis, recibiendo la célula un estímulo de continuo crecimiento (18)

Según los datos obtenidos en diferentes modelos, parece que el papel fundamental de *K-RAS* es mantener activadas aquellas células que ya presentan un estímulo de proliferación por mutaciones de *APC* (128).

La proteína *p53* se une al ADN actuando como factor de transcripción de genes inhibidores del crecimiento. Su función es crucial cuando las células están sometidas a

estrés, deteniendo el ciclo celular como respuesta a estímulos que pueden dañar el ADN, como la hipoxia, para favorecer la reparación del mismo (99). El gen que codifica para p53, se encuentra alterado en el 75% de los CCR, sin embargo es excepcional su pérdida en los adenomas, lo que significa que la pérdida es un evento tardío dentro de la secuencia de la tumorigénesis (92)(46). Otras mutaciones identificadas, como la alteración en la vía de señalización de TGF- β , que tiene normalmente un efecto inhibitorio, o DCC que está implicado en la interacción entre las células y la matriz extracelular, son necesarias para desarrollar un perfil invasor (46)(118).

El fallo del sistema de reparación de ADN

El fallo del sistema de reparación de ADN, también contribuye al desarrollo de tumores de colon. Las mutaciones en estos genes inducen errores de replicación de ADN, originando lo que se conoce como IMS. Los genes MMR (mismatch repair), son genes que regulan la corrección de los emparejamientos incorrectos o pequeñas inserciones que se producen en la replicación del ADN. Entre ellos encontramos *MSH2*, *MLH1*, *PSM1* y *PSM2*, *MSH6* o *MLH3* (13)(14). Las alteraciones germinales de estos genes provocan el síndrome de Lynch (SL). Por otro lado existen pacientes con fenotipo de SL, sin expresión de las proteínas encargadas de la reparación del ADN, pero que no presentan alteraciones en la secuencia genética de los MMR; su expresión se ve trucada por mecanismos epigenéticos, como por ejemplo la metilación de *MLH1* (159)(120). La alteración del sistema reparador de genes conduce a la acumulación de errores en los microsatélites (152). Genes supresores de tumores como *TGF- β RII*, *IGFIIR*, *MSH3* y *BAX* no son reparados y pierden su función.

Los tumores con IMS representan el 10-15% de todos los CCR, y es habitual en las formas hereditarias como el SL, cuya base molecular son mutaciones a nivel germinal. Mientras, en los casos esporádicos, el mecanismo de IMS sería debido a la hipermetilación a nivel de la región promotora, de cualquiera de los genes relacionados con el sistema de reparación del ADN (60).

En el año 1997 se estableció un panel de cinco marcadores genéticos (“panel de Bethesda”) para el análisis de IMS: dos repeticiones de mononucleótidos (BAT25 y BAT26), y tres repeticiones de dinucleótidos (D2S123, D5S346 y D17S250) (14). Dicho panel es el más utilizado actualmente y clasifica los tumores en tres grupos:

- Tumores de alta IMS (inestabilidad en dos o más marcadores)
- Tumores de baja IMS (inestabilidad en un solo marcador)
- Tumores sin IMS o estables (EMS), cuando ningún marcador muestra IMS.

Además de servir como herramienta para la identificar casos de SL, la IMS tiene importantes implicaciones pronósticas y terapéuticas. Por una parte, parece que los CCR con IMS presentan un mejor pronóstico, mientras que, por otro lado, presentarían una resistencia al 5-fluorouracilo. Los casos con IMS esporádicos (15% del total de CCR esporádicos) pueden ser debidos a hipermetilación del promotor de *MLH1*, pudiendo ser diferenciados de aquellos con SL mediante la realización de pruebas dirigidas a evidenciar esta circunstancia.

Vía serrada o fenotipo metilador

El fenotipo metilador (FM) o vía serrada es la vía de carcinogénesis identificada más recientemente. Aproximadamente el 30% de los CCR se deben a este mecanismo (166) (158)(192)(3).

Se caracteriza por la metilación de regiones ricas en citosina y guanina, denominadas islas *CpG*, promotoras de genes supresores de tumores. Los tumores que surgen de esta vía representan aproximadamente el 35 % de los CCR. Éstos tumores surgen de una lesión precursora serrada, donde es muy habitual la metilación de islotes *CpG* de regiones promotoras de múltiples genes, provocando el silenciamiento epigenético (inactivación) de varios genes de forma aleatoria. Esto da lugar a lo que se conoce como fenotipo metilador de las islas *CpG* (CIMP), que se determina cuantificando la proporción de loci metilados entre una selección de los genes más frecuente afectados.

Se distinguen tres fenotipos CIMP:

- ausencia de metilación (CIMP-0)
- metilación baja (CIMP-L)
- metilación alta (CIMP-H)

El proceso de carcinogénesis comienza habitualmente con la mutación del gen *BRAF*, que supone la inhibición de la apoptosis fisiológica a nivel de las células epiteliales del colon y la metilación del promotor de *MLH1*, originando los casos de CCR esporádicos con IMS. (176)(24)(202).

En el estudio molecular de los pólipos serrados, a diferencia de los adenomas convencionales, se observa que la mutación de *BRAF* se observa ya en las lesiones precursoras (87); lo que sugiere que esta mutación es un acontecimiento temprano dentro de la vía serrada de carcinogénesis (161). Sin embargo son necesarias otras alteraciones moleculares para desarrollar un pólipo avanzado o progresar a CCR.

El silenciamiento mediante la metilación de genes relacionados con la supresión de tumores, puede ser un mecanismo sencillo que desencadena la progresión de la lesión. De esta forma, se explicaría la frecuente correlación descrita entre la mutación *BRAF* y CIMP. De modo que en estudios moleculares de CCR se ha observado que la asociación mutación *BRAF* y CIMP presenta una odds ratio de 203 (196).

MACS (“microsatellite and chromosomal stable”)

Recientemente, varios estudios han descrito la presencia de un porcentaje de casos de CCR que no presentan ni INC ni IMS y además no pertenecen estrictamente a la vía serrada. Este subgrupo de CCR, conocido como MACS, presenta características clínico-patológicas y moleculares diferentes a otros CCR; lo que sugiere que podrían seguir una vía de carcinogénesis diferente. Los MACS se identifican con más frecuencia en los CCR de pacientes jóvenes (71). Además presentan una mayor predilección por el colon izquierdo y recto, y parecen asociarse a peor pronóstico, detectándose metástasis en el momento del diagnóstico. Otras características clínico-patológicas, sin embargo, son similares a las descritas para el CCR con IMS (72)(32).

Por el momento, no hay unanimidad en la información obtenida, aunque parece claro que los MACS se asocian con un perfil de metilación de ADN diferente, en el que están implicados genes poco habituales (86)(174)(181) (28)(9).

1.2.3. Clasificación molecular de los CCR

Por último, es importante señalar que en los últimos años está adquiriendo importancia la aparición de una clasificación molecular, basada en los tres eventos moleculares principales descritos con anterioridad (INC, IMS y FM), siendo un reflejo de los mecanismos subyacentes de carcinogénesis.

Por tanto los CCR se podrían clasificar, según sus características moleculares, en cuatro grupos principales:

- Tumores IMS y FM bajo.
- Tumores IMS con FM alto.
- Tumores EMS y FM bajo
- Tumores EMS y FM alto

La participación de una u otra vía se correlaciona con algunos aspectos clínicos y características anatomo-patológicas (Tabla 1). (143)

Inestabilidad cromosómica	Inestabilidad de microsatélites	Fenotipo metilador
LOH Aneuploidía o poliploidía	IMS Diploidía	Metilación promotores de genes Alteraciones epigenéticas
Localización preferentemente		
Izquierda	Derecha	Derecha
Características histológicas		
Bien diferenciados No infiltración linfocítica Raramente mucinosos Peor pronóstico	Pobremente diferenciados Infiltración linfocítica Frecuentemente mucinosos Mejor pronóstico	Pobremente diferenciados
Tabla 1: Características diferenciadoras entre los CCR que presentan inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites y fenotipo metilador. Modificado de la Chapelle 2003.		

1.3. PÓLIPOS COLÓNICOS: LESIONES PRECURSORAS DEL CCR

Los pólipos colónicos son crecimientos exofíticos de la mucosa del colon y constituyen el primer paso en el proceso de carcinogénesis. Pueden presentar tamaño, morfología y características histológicas variables que son cruciales para determinar el potencial de malignidad.

La mayoría de los cánceres de colon surgen a partir de los denominados pólipos adenomatosos, siguiendo el modelo de tumorigénesis clásico. No obstante, en los últimos años se da cada vez más importancia a los pólipos serrados y su capacidad para desarrollar neoplasias invasivas.

1.3.1. Pólipos adenomatosos

Los pólipos adenomatosos son las lesiones proliferativas más frecuentes del colon, se estima que aproximadamente el 30% de las personas de 50 años presentan algún pólipo adenomatoso; esta proporción se incrementa con la edad, alcanzando el 50% a los 70 (198). El riesgo de malignización de los pólipos adenomatosos depende de:

- *Las características morfológicas:* Los pólipos deprimidos de la clasificación de París (182), IIc y III, presentan mayor riesgo de progresión a carcinoma invasivo (Figura 8) (69).
- *Las características histológicas:* los pólipos con componente vellosos (200) o con displasia de alto grado (5) presentan mayor riesgo de carcinoma invasivo y de tumores metacrónicos después de su resección.
- *El tamaño de los pólipos:* Los pólipos mayores de 10 mm presentan características histológicas de mayor riesgo (140)(109)(202)(26),
- *El número de pólipos:* El **número** de pólipos avanzados encontrados en la primera colonoscopia y en las sucesivas es uno de los factores de riesgo más consistentes para el desarrollo de una neoplasia metacrónica (200).

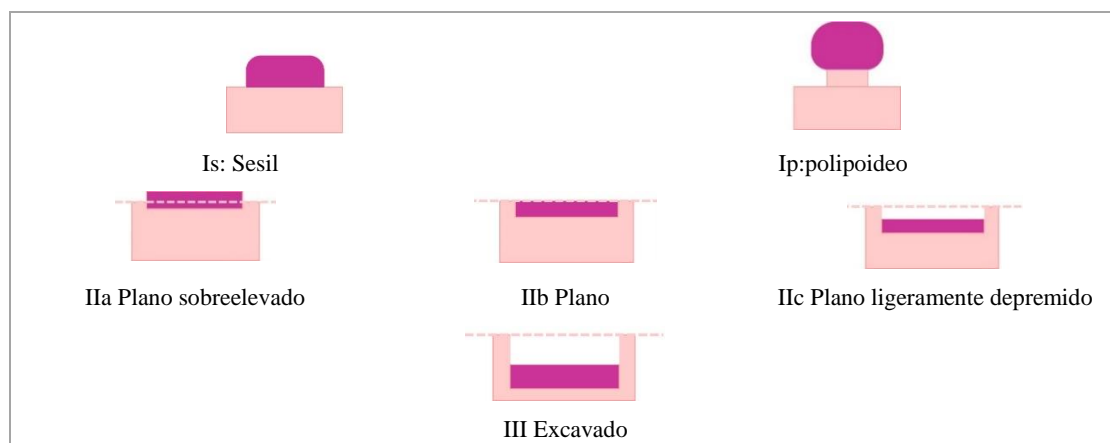


Figura 8. Clasificación de París: clasificación morfológica de los pólipos de colon

1.3.2. Pólipos serrados

En 2011 la Organización Mundial de la Salud estableció una nueva clasificación de los pólipos hiperplásicos, distinguiendo los pólipos hiperplásicos propiamente dichos, de los pólipos serrados (158) adoptando las recomendaciones previamente establecidas por Snover et al. (177) (183). En los pólipos hiperplásicos se diferencian a su vez dos subtipos: tipo rico en células globosas (GCHP) y tipo microvesicular (MVHP). Estos últimos presentan la capacidad de progresar a pólipos sésiles serrados. Los pólipos serrados se subclasifican en pólipo sésil serrado y Polipo serrado tradicional.

Los pólipos serrados presentan, desde el punto de vista histológico, un aspecto dentado del epitelio de las criptas y característicamente surgen en el colon proximal (105).

Los pólipos serrados son lesiones precancerosas que hasta en un tercio de las ocasiones desarrollan CCR. La probabilidad de desarrollar CCR es todavía mayor si se dan fenómenos de inestabilidad de los microsátélites. (209)(24). Los adenomas serrados siguen una vía de transformación a cáncer distinta a la secuencia adenoma-carcinoma convencional (Figura 9). En la Tabla 2 se muestran las diferencias entre las dos secuencias de carcinogénesis mencionadas(1).

Se ha descrito que la progresión hacia CCR es más rápida que en los adenomas convencionales, lo que posibilita la aparición de lesiones sincrónicas (134)(24)

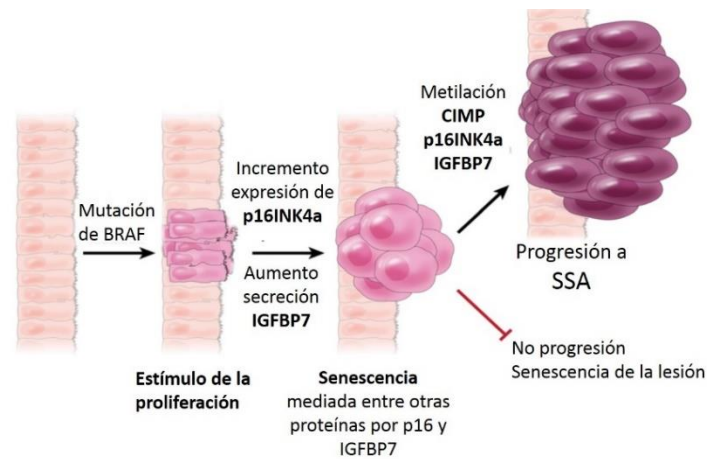


Figura 9. Secuencia de alteraciones moleculares implicadas en el desarrollo de adenomas serrados sésiles (SSA). Modificado de Leggett and Whitehall, 2010.

Los resultados de los estudios del potencial carcinogénico de la vía serrada son muy heterogéneos, ya que la prevalencia descrita de estas lesiones varía en los diferentes estudios debido a la falta de uniformidad de criterios diagnósticos. La fiabilidad diagnóstica se puede ver condicionada tanto por la variabilidad inter-observador de patólogos y endoscopistas como por la disponibilidad de técnicas de amplificación o de alta definición en los equipos, que facilite la detección de las lesiones (162)(105).

Características de la secuencia a carcinoma	Desde adenoma convencional	Desde adenoma serrado
Localización	A lo largo de todo el colon	Predilección colon derecho
Morfología	Pedunculado/Sésil	Sésil, plano
Progresión desde displasia	Menos frecuente	Más frecuente
Alteración genética	Mutación gen <i>APC</i> , <i>p53</i>	Mutación gen <i>BRAF</i>
Hipermetilación de DNA	Infrecuente	Frecuente
IMS	Raro	Típico (inactivación de <i>hMLH1</i>)
Síndromes relacionados	PAF	Poliposis serrada
% del CCR esporádico	85%	15%

Tabla 2: Características de las dos vías principales de generación de pólipos colónicos

1.4. FACTORES ETIOLÓGICOS

Los mecanismos que participan en el desarrollo y progresión del CCR son complejos. En las últimas décadas, se ha avanzado significativamente en la comprensión del proceso de la carcinogénesis, no sólo en la identificación de los factores genéticos y moleculares implicados, sino también en la caracterización de los aspectos epidemiológicos (31). A continuación se describen los principales mecanismos de susceptibilidad genética y ambiental para el desarrollo de CCR.

1.4.1. Cáncer heredofamiliar

Las personas con historia personal o familiar de CCR presentan mayor riesgo que la población general, estimándose que aproximadamente el 30% de todos los casos de CCR se deben fundamentalmente a la predisposición familiar (108) (60).

El 25% de los casos con agregación familiar, se producen por alteraciones genéticas con baja penetrancia o por alteraciones en múltiples “loci” de susceptibilidad con un efecto sumatorio, confiriendo un riesgo intermedio para CCR en la población afecta. Tan sólo el 5% restante, se debe a mutaciones de alto riesgo, bien caracterizadas y que corresponden a los síndromes de CCR heredofamiliar clásicos (SL, PAF). Existen otras entidades de frecuencia marginal como la Poliposis asociada al gen MUTYH o las Poliposis Hamartomatosas (Figura 10).

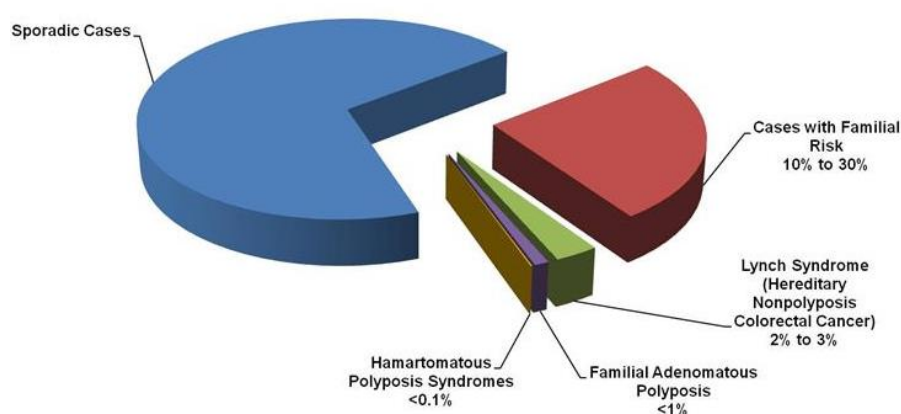


Figura 10: Importancia relativa de los diferentes síndromes de CCR heredofamiliar. Extraído de Burt et al, Gastroenterology, Vol. 119, No. 3 (25)

En estos pacientes es fundamental la realización de una historia familiar. Su fiabilidad puede verse afectada por diferentes factores. Pueden desconocerse enfermedades de parte de los familiares. En las familias de pequeño tamaño o con muertes prematuras pueden limitarse la información. Finalmente debido a la penetrancia incompleta de algunos genes, un individuo puede portar los genes que predisponen para CCR, pero nunca desarrollar la enfermedad, lo que da la impresión de que la afectación no se transmite a lo largo de las generaciones. La historia referida por el paciente debe verificarse, dentro de lo posible con informes médicos.

Síndrome de Lych.

El SL es el resultado de mutaciones a nivel germinal de los genes MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*). Los dos primeros son responsables de más del 90% de los casos genéticamente definidos, alcanzando el 10% aquellas que afectan a *MSH6* (164). Estas alteraciones dan lugar a la acumulación de secuencias genéticas llamadas microsatélites y mutaciones en genes supresores de tumores (*TGF*, *BRII* y *BAX*) (154).

Es la forma más común de CCR hereditario, su transmisión es autosómica dominante y comprende aproximadamente el 1-6% de todos los cánceres colorectales. La media de edad al diagnóstico es de 44 años, aproximadamente 20 años antes de la edad media de presentación del CCR esporádico. El SL se caracteriza por localizarse frecuentemente en el colon derecho, tratarse de tumores de bajo grado de diferenciación y de predominio mucinoso, presentando habitualmente de células en anillo de sello e infiltración linfoide tumoral (81).

El SL también al desarrollo de neoplasias en otras localizaciones extracolónicas. El cáncer de endometrio es la neoplasia extracolónica más frecuente asociada al SL, con un riesgo de desarrollo del 40-60%. Otras neoplasias asociadas son las gástricas, de ovario, intestino delgado, epitelio hepatobiliar, urotelial, cerebro y páncreas (80) (188)(8).

Los individuos afectados por el SL desarrollan pólipos con más frecuencia que la población general, de mayor tamaño y aparecen a edades más tempranas. Además, se

ha observado que la progresión a la malignización es mucho más rápida (80)(89). Por todo ello, en el SL se observa una mayor incidencia de CCR múltiples, tanto sincrónicos (18%) como metacrónicos (24%) (90)(8)(80)(31).

Aunando los diferentes factores característicos del SL, se han desarrollado una serie de criterios que permiten sospechar la presencia del síndrome. En 1990, el grupo colaborador internacional de cáncer de colon hereditario no asociado a poliposis (CCHNP) propuso los denominados “criterios de Ámsterdam”, que posteriormente han sufrido diferentes modificaciones hasta desarrollar los criterios de Bethesda.

Los criterios de Bethesda son menos estrictos y por tanto presentan mayor sensibilidad aunque menor especificidad (14). En los últimos años, se están validando diversos modelos matemáticos, como el PREMM 126, MMRpro o MMRpredict predictivos que ayudarían a facilitar el diagnóstico del SL (199).

Los criterios clínicos sirven para identificar a los pacientes con riesgo de SL y que, por tanto, requieren ser estudiados con mayor profundidad (Tabla 3). El siguiente paso en el proceso diagnóstico es la detección bien de IMS o bien la ausencia de expresión de las de las proteínas de reparación del ADN con el estudio inmunohistoquímico. Diversos estudios han demostrado que el valor predictivo positivo de los criterios de Ámsterdam I para la identificación de mutaciones alcanza el 50%, mientras que los de Bethesda es del 10-20% (197).

Ámsterdam I

1. Tres o más familiares con CCR, uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos.
2. Al menos dos generaciones afectadas.
3. Uno o más casos de cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
4. Habiendo descartado la PAF.

Ámsterdam II

1. Tres o más familiares con un cáncer asociado al CCHNP (colorrectal, endometrio, intestino delgado, ovario, uréter, pelvis renal, cerebro, tracto hepatobiliar, tumores sebáceos de piel), uno de los cuales es familiar de primer grado de los otros dos.
2. El cáncer colorrectal aparece al menos en dos generaciones.
3. Uno o más casos de cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
4. Habiendo descartado la PAF.

Bethesda modificados

1. Cáncer colorrectal diagnosticado antes de los 50 años.
2. Individuos con dos cánceres asociados al CCHNP, incluyendo cánceres colorrectales sincrónicos y metacrónicos o cánceres extracolónicos asociados al SL, independientemente de la edad.
3. Cáncer colorrectal con fenotipo de Inestabilidad de Microsatélites alta (presencia de linfocitos infiltrantes de tumor, carcinoma con diferenciación mucinosa o en anillo de sello, reacción linfocitaria peritumoral tipo Crohn, patrón de crecimiento medular), diagnosticado antes de los 60 años.
4. Individuos con cáncer colorrectal y un familiar de primer grado con cáncer colorrectal y/o un cáncer extracolónico asociado al SL; uno ellos diagnosticado antes de los 50 años.
5. Individuos con cáncer colorrectal y al menos dos familiares de primer o segundo grado con cáncer colorrectal y/o un cáncer extracolónico asociado al SL; independientemente de la edad.
6. Cáncer colorrectal de células en anillo de sello diagnosticado antes de los 45 años.

Tabla 3. Criterios clínicos de Amsterdam y de Bethesda para la sospecha del SL

El estudio de expresión de las proteínas del sistema de reparación del ADN MLH1, MSH2, MSH6 y PMS2, mediante inmunohistoquímica permite seleccionar a los sujetos candidatos a la determinación de los genes relacionados con el SL.

El estudio de la inestabilidad de los microsatélites, es también una buena aproximación para el diagnóstico de alteraciones en el sistema del MMR. Sin embargo, esta característica del tumor en el SL no es específica del mismo, ya que algunos CCR esporádicos también presentan IMS (123)(82)(133)

Poliposis Adenomatosa:

La Poliposis Adenomatosa Familiar (PAF) es una enfermedad autosómica dominante, con una prevalencia aproximada de 1 de cada 10.000-20.000 individuos (Castells y Marzo 2009). La PAF es el segundo síndrome hereditario más frecuente, aunque representa menos del 1% del total de CCR. Está causada por mutaciones germinales en uno de los alelos del gen supresor APC (adenomatous polyposis coli) localizado en 5q21 y tiene una penetrancia del 100%. Aproximadamente un tercio de los casos de PAF son casos “de novo”, pudiendo transmitir la enfermedad a su descendencia (80, 189)

La PAF se define por el desarrollo de cientos a miles de adenomas a nivel de colon y recto a partir de la adolescencia y con un potencial de malignización del 100% antes

de la cuarta década de la vida. La cirugía profiláctica es necesaria en estos pacientes, para prevenir el desarrollo de CCR.

La localización más frecuente de los tumores es el colon izquierdo (70-80%) (101) aunque también pueden presentar afectación del tracto digestivo superior, con una prevalencia de adenocarcinoma de duodeno entre el 1 y el 10% de los pacientes. Otras manifestaciones extracolónicas habituales son los tumores desmoides (10% de los pacientes), quistes epidérmicos, cáncer de tiroides, meduloblastomas, hipertrofia congénita del epitelio pigmentario de la retina o hepatoblastomas (8, 80, 153).

La Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA) se caracteriza por la proliferación de pólipos a lo largo del colon aunque en menor cantidad que en la PAF clásica, la media de pólipos se sitúa en torno a 30. La edad media de presentación es superior a la PAF clásica y los tumores tienden a localizarse en el colon derecho. Solo en alrededor del 10% de los casos se identifica mutación a nivel de *APC* (54).

Un 30% aproximadamente de las familias con adenomas múltiples (15-100), que no presentan mutación en el gen *APC*, presentan mutaciones del *MYH*, también llamado *MUTYH* (171).

La Poliposis asociada a *MYH*, es una enfermedad autosómica recesiva, donde aparecen tanto pólipos adenomatosos como hiperplásicos, con un riesgo aumentado de CCR y sin una predilección especial en la localización del colon.

Debido a su similitud con la PAF atenuada, desde el punto de vista fenotípico, se debe de llevar a cabo el test genético en todos los individuos con más de 10 adenomas colorrectales sin mutación en el gen *APC*).

El síndrome de Gardner, también es una variante de la PAF en la que, además de la aparición de los pólipos colorrectales, existen una variedad de manifestaciones extracolónicas, entre las que destacan los osteomas (sobre todo en cráneo y mandíbula), alteraciones dentales, quistes epidérmicos, fibromatosis retroperitoneal o mesentérica.

Por último, *el síndrome de Turcot* es otra variante de la PAF en la cual se desarrollan tumores del sistema nervioso central, generalmente gliomas malignos o meduloblastomas. Este síndrome se debe a mutaciones en el gen *APC*, aunque también se han descrito casos asociados a mutaciones los genes *MMR*.

Poliposis hamartomatosas

Dentro de este grupo se encuentran el Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ) y la Poliposis Juvenil (PJ), en los que existe igualmente un riesgo aumentado de desarrollar CCR y otras neoplasias malignas. En el caso del SPJ las lesiones características son pólipos hamartomatosos en el intestino delgado (96%) (119). En el estómago y el colon se encuentran en el 25-30% de los casos respectivamente.

Clínicamente debutan en la juventud con complicaciones locales provocadas por los hamartomas, habitualmente sangrado u obstrucción. La característica externa más típica es la pigmentación mucocutánea, en labios, mucosa oral y periorbitaria. El riesgo de desarrollar cáncer a lo largo de la vida se estima entre el 81% y el 93%, pudiendo afectar al tracto gastrointestinal, la mama o el páncreas (52). La única causa conocida del SPJ son mutaciones a nivel germinal en el gen *STK11*, mientras que para la PJ pueden afectarse tanto *SMAD4* como *BMPR1A*.

Poliposis serrada

La *poliposis hiperplásica o poliposis serrada* (PS), es una entidad infrecuente y difícil de diagnósticas por la morfología de los pólipos, en la que aparecen múltiples pólipos de tipo hiperplásicos. El síndrome PS, se define por la presencia de los siguientes criterios (177):

- Al menos cinco pólipos serrados con localización proximal a sigma, con al menos dos de ellos mayores de 10 mm.
- Cualquier número de pólipos serrados localizados en los segmentos proximales a sigma, en un individuo con un familiar de primer grado diagnosticado de PS.

- La presencia de más de 20 pólipos serrados de cualquier tamaño distribuidos a lo largo del colon.

En el síndrome de PS la prevalencia de CCR alcanza el 35% (15) y se ha demostrado un incremento significativa de tumores sincrónicos y metacrónicos. Los tumores se localizan preferentemente en el colon derecho (105). Los tumores asientan fundamentalmente en el colon derecho (208).

La PS tiene un carácter familiar, pero aún no está bien definido el patrón hereditario. La alteración molecular característica de este síndrome son las mutaciones del gen *BRAF*, aunque en un 50% de los casos se asociaba la presencia de IMS (110).

Cáncer Colorrectal familiar tipo X

Existen familias que, a pesar de cumplir los criterios clínicos de Ámsterdam, presentan tumores donde la expresión de las proteínas del sistema de reparación está intacta, tampoco presentan IMS, ni alteración de los genes MMR. Este grupo se denomina Cáncer Colorrectal Familiar tipo X, y presenta características diferenciales frente al SL. No presentan neoplasias en otros órganos y el diagnóstico se produce a edades más avanzadas.

Mutaciones de *POLE* y *POLD*

Las mutaciones en los genes relacionados con la ADN-polimerasa *POLE* y *POLD* se asocian con el desarrollo de CCR en el contexto de poliposis y cáncer de endometrio (147). Estas mutaciones se han identificado en familias con agregación para CCR y con negatividad para *APC*, *MYH* y genes relacionados con MMR. El patrón de transmisión sugiere una herencia autosómica dominante. Se recomienda el estudio genético de estas variantes en pacientes con múltiples pólipos, en los que no se identifica un patrón molecular que explique la predisposición familiar (20).

1.4.2. Cáncer esporádico

El CCR es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales que son decisivos para el desarrollo de la enfermedad. Se ha observado un incremento del número de casos de CCR en inmigrantes que se desplazan desde zonas de baja incidencia hacia otras de alta incidencia(65).

Existen múltiples factores que pueden influir en este cambio de incidencia, desde la exposición a tóxicos, la modificación de los hábitos de vida, la dieta, o agentes infecciosos(84). Sin embargo, es difícil determinar con certeza la importancia relativa de cada uno de estos elementos.

Agentes tóxicos

El consumo de tabaco incrementa la incidencia y la mortalidad del CCR en todos los grupos de población, pero presenta especial relevancia en los pacientes con predisposición genética previa, como el síndrome de Lynch (148). Incrementa el riesgo de desarrollo tanto de pólipos adenomatosos avanzados como de pólipos serrados (194).

El alcohol parece tener un efecto dosis dependiente, con apenas efecto en los bebedores ocasionales, llegando a alcanzar un riesgo relativo de 1.52 en el abuso de alcohol (47). La interferencia con la absorción de folato, se considera uno de los mecanismos más importantes. La dieta puede modificar el riesgo de CCR al poder producir su incremento (67).

Dieta

La dieta se considera uno de los factores más relevantes en la modificación del riesgo de CCR ya que el colon es un órgano expuesto de forma constante a las sustancias ingeridas y a los productos de su digestión(194).

Koushik et al, en un metanálisis indica, que la dieta rica en fruta y verduras reduce el riesgo de CCR, con un RR de 0.92 (IC 0.86-0.99), fundamentalmente reduciendo casos de colon distal (94). No queda claro si el efecto protector tiene relación con el consumo

de fibra, ya que algunos estudios han observado que con el consumo de 10 gramos de fibra diaria, se alcanzaba una reducción de riesgo de un 10% (6), no se han confirmado estos resultados en otros trabajos (169)(4). La variabilidad entre los estudios pueden deberse al efecto que producen los diferentes tipos de fibra. La fibra no procesada, de grano entero, parece tener más beneficio que la fibra procesada (116).

Aunque no hay datos consistentes acerca del consumo de carne roja, esta se ha relacionado con el incremento de CCR y fundamentalmente con CCR de colon derecho. Al parecer la forma de procesarla también puede modificar el riesgo. Algunos autores han indicado que los hidrocarburos aromáticos y otros productos de la combustión de la carne, cuando se procesa a altas temperaturas (barbacoa), pueden incrementar el riesgo de CCR (135). Algunos autores han indicado que la susceptibilidad a estos agentes puede estar promovida por cierta predisposición personal (49).

También existe controversia sobre el papel de la cafeína. Existe un metanálisis que incluye 12 estudios de casos y controles que atribuye un factor protector al consumo de café a dosis altas (55), sin embargo, otros estudios lo contradicen. (122)(39).

El consumo de suplementos de calcio se ha asociado a una incidencia menor de pólipos adenomatosos, así como una disminución del riesgo de recurrencia de CCR (172). En los estudios realizados no se ha comprobado que disminuya la tasa de carcinoma invasivo (193). Por otra parte la vitamina D y sus metabolitos actúan como inhibidores de la progresión del cáncer de colon (27). El incremento de los niveles séricos de vitamina D, se asocia a una disminución del riesgo de CCR. Por cada incremento de 10 mmol/L se observaba un descenso del 6% en la prevalencia (34). Sin embargo, no queda clara la asociación causal y los posibles factores de confusión.

El síndrome metabólico.

La obesidad incrementa el riesgo de padecer CCR en 1.5 veces respecto a la población con índice de masa corporal (IMC) normal (138)(56). Aunque el sobrepeso es un factor de riesgo para los dos sexos, parece más importante en los hombres que en las mujeres. Por cada 5 Kg/m² de IMC, se incrementa el riesgo de CCR en un 24% en los

hombres y sólo en un 9% en las mujeres (157). Se ha observado que la diabetes y más en concreto la resistencia a la insulina, incrementa el riesgo de CCR y el riesgo de recurrencia tras el tratamiento (210) (50). Este hecho se debe fundamentalmente a que la insulina es un factor de crecimiento para las células de la mucosa intestinal. Los pacientes con niveles del factor de crecimiento IGF-1 (insulin-like growth factor) más altos presentan un riesgo relativo de 2.51 (IC 95% 1.15-5.46) que los pacientes con niveles más bajos. Por otro lado, al parecer, los niveles altos de la proteína ligadora de IGF (IGFBP-3), presenta un papel protector (115)

Enfermedad inflamatoria intestinal

Los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en sus dos variantes, la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa, presentan mayor probabilidad de desarrollar un CCR. El riesgo de CCR en la EII es 2-3 veces mayor que en la población general. El riesgo aumenta es mayor en función de: (42) (198)(21)

- Los años desde el diagnóstico de la enfermedad (2% a los 10 años, el 8% a los 20 años, hasta 18% a los 30 años)
- La severidad
- La extensión de la enfermedad (5.7% en los casos de pancolitis)
- La asociación con colangitis esclerosante secundaria

Los mecanismos de la inflamación crónica, responsables de la carcinogenesis incluyen tanto citoquinas, factores de crecimiento, enzimas de degradación de la matriz extracelular, como la producción de radicales libres de oxígeno y nitrógeno, que inducen inestabilidad cromosómica (70). El ambiente inflamatorio afecta a todas las fases del desarrollo del CCR.

- Al inicio del desarrollo, en la fase premaligna, promoviendo el daño del ADN y la inestabilidad cromosómica.
- Facilita la transformación infiltrativa, inhibiendo la apoptosis y acelerando la proliferación y la angiogénesis.

- Finalmente promueve la progresión del tumor y las metástasis, estimulando el crecimiento del tumor y desarrollando nuevos cambios genéticos.

Es importante considerar, además, que la inflamación crónica puede promover la transformación celular a través del daño directo del ADN y por procesos de metilación, el tumor también incrementa la respuesta inflamatoria, retroalimentándose ambos procesos (66)(63).

En la EII, el proceso hasta el desarrollo del CCR, no obedece al patrón clásico de la secuencia adenoma-carcinoma y la transición de la mucosa normal a displasia de alto grado, no está tan claramente delimitada (203)(83). La carcinogénesis en el CCR asociado a enfermedad inflamatoria intestinal, difiere de la secuencia habitual de acontecimientos respecto a la de los casos esporádicos (203) donde las alteraciones del gen *APC* ocurre de una manera precoz y las alteraciones de p53 se observan en las lesiones que ya presentan un fenotipo agresivo. En la EII, se han observado zonas de mucosa sin displasia, que ya presentaban con mutaciones de la p53.

Los fenómenos de metilación del ADN favorecen la aparición de focos de displasia de una manera amplia, a lo largo de toda la mucosa colónica inflamada (78), lo que provoca una alta tasa de cáncer sincrónico y metacrónico (107). En ausencia de inflamación activa, cualquier grado de displasia debe considerarse ya que hasta el 42% de los pacientes con displasia de alto grado presentaban un CCR sincrónico. Entre el 16 y el 27% de los pacientes con displasia de bajo grado presentaban displasia de alto grado e incluso CCR sincrónico en otros segmentos. (43). En estos casos es necesario, un seguimiento estrecho con colonoscopia en 3 o 6 meses. Si se encontrase displasia de bajo grado multifocal se podría plantear incluso la colectomía profiláctica (43)(74).

Prevención

Los datos existentes, sobre los factores ambientales como causa directa del CCR, no tienen la suficiente consistencia como para fijar unas directrices claras, en la prevención primaria del mismo.

En principio, una dieta rica en leche y otros productos lácteos pueden servir para la prevención del CCR; y las dietas ricas en fibra, vegetales y fruta actúan en la misma dirección. Hasta el momento, no se ha confirmado en estudios prospectivos el efecto protector de la administración de folatos, calcio y vitamina D, ni tampoco betacarotenos, selenio, ni vitaminas A, B, C o E.

En cuanto a los estilos de vida, se recomienda la realización de ejercicio físico evitando el sobrepeso y la obesidad, así como el consumo de alcohol y tabaco. Aunque es posible que los AINES, o la AAS a dosis baja, puedan contribuir a reducir el riesgo de CCR, la evidencia actual no apoya su uso como forma de prevención primaria del CCR (34)(157)(47).

1.5. CONSIDERACIONES CLÍNICAS

1.5.1. Diagnóstico

El pronóstico del CCR varía de forma significativa en función del estadio en el momento del diagnóstico (141). Estas consideraciones han llevado a sugerir estrategias para el diagnóstico precoz en pacientes asintomáticos en función del riesgo para desarrollo de CCR (190)(31). Se considera población de riesgo intermedio a los mayores de 50 años, puesto que a partir de esta edad se incrementa significativamente la incidencia de CCR (48). Los individuos con factores de riesgo personal o familiar para el desarrollo de CCR se consideran de alto riesgo y son tributarios de esquemas de cribado específicos.

En ocasiones el diagnóstico se establece cuando el paciente presenta síntomas sintomatología digestiva. Entre los signos y síntomas de alarma de neoplasia, se encuentran: el cambio de ritmo intestinal, la presencia de masa abdominal o anal, el desarrollo de síndrome constitucional, la anemia y el sangrado mezclado con las deposiciones. En esta situación la colonoscopia se considera la prueba de elección con una sensibilidad del 90-95% para detectar tumores y un índice de complicaciones de

0,1% en pruebas diagnósticas (del 2% en pruebas terapéuticas), siendo la hemorragia y la perforación las principales(170).

Estudio de extensión

Tras el diagnóstico de un CCR, es necesaria la realización de una colonoscopia completa para descartar la presencia de lesiones sincrónicas (3-5%) o pólipos asociados al tumor (30%). En caso de no poder visualizar todo el colon se debe realizar una técnica complementaria para valorar el resto del colon. Se puede realizar un enema opaco, una colonoscopia intraoperatoria o preferentemente un TAC-colonoscopia (Codina A et al. 2003, Cunningham D et al. 2010)(37).

La evaluación preoperatoria es fundamental para determinar la extensión anatómica del tumor y así poder para planificar el tratamiento, establecer el pronóstico y evaluar los resultados (Lledó 2000). Para ello, se dispone de diferentes pruebas entre las que destacan la ecografía, la Tomografía computarizada (TAC) o Resonancia magnética nuclear (RMN).

La ecografía endorrectal y la RMN son pruebas diagnósticas que permiten determinar el grado de invasión del tumor a través de la pared rectal y la afectación de los ganglios (Figura 11).

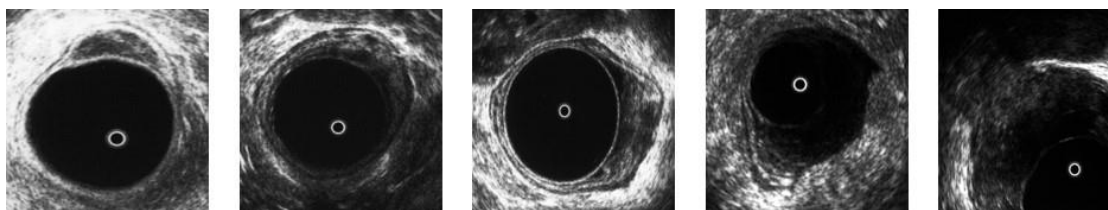


Figura 11: Estadificación sucesiva mediante ecografía endorrectal preoperatoria de diferentes cánceres de recto según el crecimiento en el espesor de la pared, desde un T0 hasta un T4, en el que hay infiltración prostática.

Clasificación por estadios.

La clasificación por estadios de los tumores colorrectales está determinado por el grado de diseminación locorregional, tanto a nivel de la pared del colon como por vía

linfática y hematógica. Se han utilizado varios sistemas de clasificación, aunque los más empleados han sido las de Dukes, Astler-Coller y finalmente la clasificación del El Comité Conjunto Americano sobre el Cáncer (AJCC) basada en el sistema TNM.

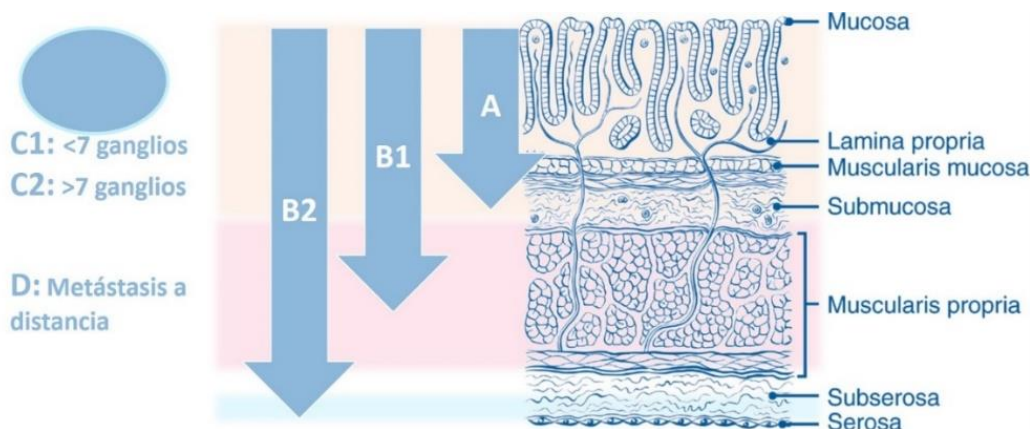


Figura 12: Clasificación modificada de Astler y Coller

En 1932, Dukes propuso su clasificación, que se caracteriza por su sencillez y por su correspondencia con el pronóstico. Se definían tres estadios, A, B y C, según el tumor invadiera la pared, sin alcanzar la subserosa, la rebasara, o hubiera afectación de ganglios loco-regionales, respectivamente. Tiempo después, en 1954, se introdujo la revisión realizada a cabo por Astler y Coller, que diferenciaba los estadios B1 y B2, así como C1 y C2, según la afectación del espesor de la pared del colon y el número de ganglios afectados. En el mismo año fue introducida la clasificación TNM (Figura 12).

El AJCC designó la estadificación mediante la clasificación TNM para definir el cáncer de colon, y es actualmente la clasificación más utilizada. El sistema AJCC/TNM describe la extensión del tumor primario (T), la ausencia o presencia de afectación de ganglios linfáticos regionales (N), y la ausencia o presencia de metástasis a distancia (M). La misma clasificación se usa tanto para la estadificación clínica como patológica (44) (<http://www.cancerstaging.org>)(Tabla 4).

Tumor primario (T)	<p>Tx: El primario no se puede evaluar.</p> <p>T0: No hay evidencia de tumor.</p> <p>Tis: Carcinoma in situ</p> <p>T1: Invade la submucosa.</p> <p>T2: Invade la muscular propia.</p> <p>T3: Invade la subserosa o tejidos pericólorrectales.</p> <p>T4a: Penetra la superficie del peritoneo visceral.</p> <p>T4b: Invade directamente o se adhiere a otros órganos o estructuras.</p>
Ganglios linfáticos regionales (N)	<p>NX: Los ganglios no pueden ser evaluados.</p> <p>N0: No hay metástasis linfática</p> <p>N1: Metástasis en 1-3 ganglios linfáticos regionales.</p> <p>N1a: Metástasis en un ganglio linfático</p> <p>N1b: Metástasis en 2 -3 ganglios linfáticos</p> <p>N1c: Afectación de subserosa o mesentéricos, perirrectales</p> <p>N2: Metástasis en ≥ 4 ganglios linfáticos regionales.</p> <p>N2a: Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos.</p> <p>N2b: Metástasis en ≥ 7 ganglios linfáticos.</p>
Metástasis a distancia (M)	<p>MX: No se puede valorar la metástasis a distancia.</p> <p>M0: No hay metástasis a distancia.</p> <p>M1: Metástasis a distancia.</p> <p>M1a: La metástasis está confinada a un órgano o sitio</p> <p>M1b: Hay metástasis en >1 órgano o sitio, o el peritoneo.</p>
<p>Tabla 4: Sistema de clasificación TNM: Calificación de extensión (T), afectación ganglionar (N) y presencia de metástasis (M).</p>	

La etapa o estadio en la que se sitúa el tumor, que va desde el “0” hasta el “4” en números romanos, viene determinada por la combinación de las categorías T, N y M del paciente, como se observa en la Tabla 5, donde también se representa la supervivencia media a los 5 años, en función del estadio al diagnóstico. Varios estudios evalúan la importancia pronóstica de diferentes características histológicas, moleculares y clínicas, sin embargo el estadio del tumor sigue siendo el mejor indicador de pronóstico a largo plazo en el CCR(141).

	N0	N1	N2a	N2b
Tis	0			
T1	I	IIIA	IIIA	IIIB
T2	I	IIIA	IIIB	IIIB
T3	IIA	IIIB	IIIB	IIIC
T4a	IIB	IIIB	IIIC	IIIC
T4b	IIC	IIIC	IIIC	IIIC
M1a	IVA con cualquier T o N			
M1b	IVB con cualquier T o N			

Supervivencia 5 años	
Estadio I:	93%
Estadio IIA:	85%
Estadio IIB:	72%
Estadio IIIA:	83%
Estadio IIIB:	64%
Estadio IIIC:	44%
Estadio IV:	8,1%

Tabla 5: A la izquierda: clasificación por estadios para el CCR según la clasificación TNM de la AJCC. A la derecha: Tasa de supervivencia a los 5 años (O'Connell, Maggard, and Ko 2004)

1.5.2. Tratamiento quirúrgico

El tratamiento del CCR depende de la localización de la neoplasia y de la estadificación de la misma. El tratamiento quirúrgico es, actualmente, el tratamiento curativo para el CCR localizado. La cirugía también ofrece una opción potencialmente curativa en pacientes seleccionados con enfermedad metastásica limitada(170).

(10) Además, incluso los pacientes que no son candidatos para la resección curativa se pueden beneficiar del tratamiento quirúrgico ante complicaciones como la obstrucción o sangrado del tumor primario. El tratamiento quirúrgico se puede complementar con tratamiento oncológico (quimioterapia y/o radioterapia) según los casos(190).

El objetivo del tratamiento quirúrgico del CCR, es la resección completa del tumor con márgenes de seguridad y la extirpación de todo el territorio ganglionar correspondiente con ligadura de los vasos principales en su origen. La cirugía oncológica radical previene la recidiva local en la mayor parte de los casos (68). A la hora de definir la extensión de la resección cólica, hay que tener en cuenta tanto los márgenes de resección, como realizar una linfadenectomía adecuada ya que

proporciona información pronóstica que ayuda a establecer el tratamiento adyuvante. La resección en bloque de los órganos adheridos, podría ser necesaria en tumores avanzados para realizar una resección R0 (35). Según la localización del cáncer, el tratamiento quirúrgico lo podemos dividir en:

- ***hemicolectomía derecha*** se realiza generalmente para tumores que asientan desde el ciego hasta la parte proximal del colon transversal. Se realiza una *hemicolectomía derecha ampliada* para tumores del colon transversal o a nivel de ángulo esplénico del colon.
- ***hemicolectomía izquierda*** es apropiada para tumores localizados en la parte distal del colon transversal o colon descendente.
- ***sigmoidectomía*** en el caso de cáncer de colon sigmoide.
- ***La colectomía total o subtotal*** está indicada cuando existen lesiones o neoplasias sincrónicas en el lado derecho e izquierdo del colon. En ocasiones, se realiza esta técnica en pacientes que presentan un cuadro de obstrucción intestinal secundario a un tumor estenosante en el lado izquierdo del colon.

En los síndromes hereditarios, como es el caso de la PAF, queda establecida la necesidad de colectomía profiláctica para evitar el desarrollo de CCR. En el caso del SL, dado que presentan un riesgo incrementado de desarrollar tumores metacrónicos y una progresión más rápida desde adenoma a carcinoma, se recomienda la realización de una resección extensa (colectomía o proctocolectomía total) para el tratamiento de las neoplasias colorrectales (31)(80). El tratamiento quirúrgico del Cáncer de Recto presenta consideraciones especiales. Actualmente con intención curativa se contemplan cuatro opciones: resección local, resección anterior, amputación abdomino-perineal, Intervención de Hartmann

Tratamiento adyuvante

En los pacientes que han sido sometidos a un tratamiento quirúrgico con intención curativa, se cree que la recurrencia de la enfermedad deriva de micrometástasis clínicamente ocultas que están presentes en el momento de la cirugía. El objetivo del

tratamiento adyuvante es la erradicación de estas micrometástasis, aumentando así el tiempo libre de enfermedad y la supervivencia total. El estadio I del CCR presenta un excelente pronóstico con una supervivencia a los cinco años del 95% y el tratamiento quirúrgico es suficiente sin necesidad de tratamiento adyuvante. En contraste, este ha demostrado claros beneficios en el estadio III de la enfermedad (una reducción del 30% en el riesgo de recurrencia y del 22 al 32% en la mortalidad). Su indicación para el estadio II es controvertida, salvo en pacientes de alto riesgo (190).

En cuanto al cáncer de recto el tratamiento neoadyuvante presenta mejores resultados que la quimio-radioterapia postoperatoria, por lo que se considera el tratamiento de elección en el cáncer de recto estadio II y III (57).

El análisis de los marcadores moleculares del tumor, se emplea para optimizar adecuar la elección del tratamiento. Por ejemplo, es bien conocido que la presencia tanto de mutación en *KRAS* como *BRAF* se asocia a resistencia al tratamiento con antiEGFR (195), y que tumores con IMS presentan peor respuesta al tratamiento con 5-FU (168). Sin embargo, no existen claros factores predictivos de respuesta a los inhibidores del factor de crecimiento vascular (VEGF) como el bevacizumab. (170)

Tratamiento paliativo

La quimioterapia paliativa ha demostrado aumentar la supervivencia en al menos el doble, controlar la aparición de enfermedad sintomática y mantener la calidad de vida durante el mayor tiempo posible. Por otro lado, en ocasiones, permite la resección quirúrgica de las metástasis (190). Al menos el 70% de los pacientes con CCR desarrollan metástasis hepáticas en el curso de su enfermedad. La resección hepática es el tratamiento potencialmente curativo, alcanzando índices de supervivencia del 58% a los 5 años (10). El objetivo de mejorar los índices de supervivencia ha de basarse en un tratamiento multidisciplinario: oncológico, quirúrgico, radiológico, anatómo-patológico, etc.

1.5.3. Seguimiento

A pesar de un tratamiento quirúrgico con intención curativa y el uso de tratamiento oncológico asociado, un 40 % de los pacientes con enfermedad en estadio II o III tendrá una recurrencia de la enfermedad después del tratamiento inicial. El seguimiento estricto de estos pacientes tras la cirugía durante los primeros años, ha demostrado descubrir las recidivas en un estadio potencialmente curable y por tanto mejorar la supervivencia (7).

Las recomendaciones de la American Society of Clinical Oncology (ASCO), indican que el seguimiento debe ser más intensivo, al menos, durante los primeros cuatro a cinco años, puesto que es el periodo de tiempo en el que se producen la mayoría de las recidivas (121). El examen endoscópico se debe repetir de la resección del tumor, para excluir tumores metacrónicos así como la recidiva sobre la anastomosis (38)(190)

1.6. CANCER COLORRECTAL SINCRÓNICO

1.6.1. Cáncer de colon múltiple

El cáncer de colon, como se ha descrito previamente es uno de los tumores más frecuentes en el ser humano. El colon presenta una gran extensión de mucosa, con un alto índice de recambio celular.

El proceso de carcinogénesis, iniciado por alteraciones genéticas, tanto de carácter hereditario, como debidas a la exposición ambiental, puede promover la aparición de diferentes focos de adenocarcinoma a lo largo de la superficie del colon y a lo largo del tiempo. Se consideran tumores múltiples primarios de colon a la presencia de al menos dos tumores independientes, que se producen en la misma persona. Se estima que hasta el 5-10% de los tumores de colon son múltiples. Cuando el diagnóstico de los dos tumores se realiza al mismo tiempo o en un corto espacio de tiempo se denominan tumores sincrónicos. Cuando el tiempo entre el diagnóstico del primer tumor y el segundo es superior a seis meses, se denominan metacrónicos (126).

Series recientes de CCR describen un riesgo de tumores metacrónicos de CCR del 3.4% a los 10 años (132). La prevalencia de CCR sincrónico se sitúa en las series más largas entre el 3.1% (85) y el 3.9% (131).

1.6.2. CCR sincrónico

La mayoría de los CCR sincrónicos aparecen en el mismo segmento o en un segmento próximo. (100). No queda claro el papel pronóstico que puede tener la consideración de un CCR sincrónico. La mayoría de los estudios no observan un aumento de la mortalidad (33)(146)(149). En cambio otros estudios encontraron peor supervivencia en los CCR sincrónicos (45)(137).

La identificación de los factores que pueden favorecer el desarrollo de CCR múltiple, supone un gran reto, ya que puede permitir estrategias preventivas (150)(156). Por ejemplo, se puede optar por una técnica de resección más amplia en los pacientes con riesgo de lesiones metacrónicas. Por otro lado se puede modificar la periodicidad de las colonoscopias de cribado (165)(132).

La primera aproximación a la multicentricidad, la encontramos en los estudios realizados tras el seguimiento de los pacientes a los que se les había resecado pólipos adenomatosos. Se ha observado que varias características de los adenomas tales como el tamaño, la presencia de componente vellosa, el número o la localización hacen predecir la aparición de nuevas lesiones años después (69).

Los tumores sincrónicos, normalmente, se originan sobre un **sustrato etiológico** común, bien genético o ambiental. En este sentido se conocen diferentes entidades que aumentan el riesgo de presentar CCR sincrónicos. En primer lugar podemos considerar los síndromes de CCR heredofamiliar y la poliposis, que por presentar mutaciones germinales promueven el desarrollo de varias lesiones a lo largo del tiempo (96). En segundo lugar, podemos pensar en aquellas enfermedades y situaciones que afectan en un determinado tiempo a una superficie extensa de la mucosa colónica y promueven la aparición de varios focos de displasia. Este es el caso de la enfermedad inflamatoria con afectación colónica de larga evolución (62).

Estas entidades con reconocido riesgo de tumores múltiples, sólo se encuentran en aproximadamente el 10% de los pacientes con CCR sincrónico (96). Por tanto existe poca información acerca de los factores que predisponen a gran parte de los CCR sincrónicos. Además, prácticamente todos los estudios hacen referencia a casos de CCR en el contexto de CCR familiar, o bien englobando todos los casos en conjunto. Por lo que existe mucha más información sobre los tumores múltiples asociados a CCR familiar.

1.6.3. CCR sincrónico familiar

La frecuencia de tumores múltiples es mucho más alta en los síndromes de CCR familiar. Mulder et al encontraron una frecuencia de 11.8% de tumores múltiples en el grupo de SL frente al 3.6% de los casos esporádicos. Desde otro punto de vista el 14% de los CCR sincrónicos presentaban SL, y hasta el 27.6% presentaban familiares de primer grado con CCR.

No existen apenas estudios que se centren en analizar las características específicas de los CCR sincrónicos fuera del contexto no hereditario.

Las guías de Bethesda actualizadas, sugieren que la presencia de tumores sincrónicos es una indicación para evaluar la posibilidad inestabilidad de microsatélites, para descartar la existencia de un SL. Sin embargo, en el estudio Hu et al, solo el 38% de los MSI-H tenían síndrome de Lynch, mientras que el 62% eran esporádicos (76).

Entre las características anatomo-clínicas de los tumores sincrónicos, se ha observado que la mediana de edad es mayor, que en los pacientes con tumores individuales (mediana de edad 70 vs. 60; $P=0.001$) (76). Sin embargo otros autores no describen diferencias en la edad (96)(100). En cuanto al sexo, la mayoría de los estudios observan mayor frecuencia en varones (156)(16)(100).

La presencia de adenomas en la colonoscopia del diagnóstico es también significativamente mayor en los pacientes con cánceres sincrónicos que en los individuales (100). Los tumores sincrónicos presentan con mayor frecuencia patrón mucoso en la histología y se asocian con frecuencia a la presencia de pólipos serrados.

La asociación de pólipos adenomatosos y serrados parece incrementar sugestivamente el riesgo de CCR sincrónico (76).

1.6.4. CCR sincrónico no hereditario

Existen varios factores ambientales reconocidos que se correlacionan con el desarrollo de CCR sincrónico. La relación entre CCR y alcohol, incluso a dosis moderadas de 20-40 gramos al día, había sido descrita previamente (145). Borda et al propusieron la ingesta de alcohol como un factor independiente para el desarrollo tanto de CCR sincrónico como metacrónico (16)(17). En el análisis multivariante al ajustar por sexo, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con el consumo de alcohol y parece que el incremento de riesgo se debía fundamentalmente, a que el consumo de alcohol es más frecuente en varones (16). De nuevo, Win et al, tampoco encontraron diferencias entre sexos, edad al diagnóstico ni consumo de tabaco(199).

Finalmente la enfermedad inflamatoria intestinal con afectación colónica es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de tumores sincrónicos. El 18% de los cánceres relacionados con la EII son sincrónicos (62). El riesgo se incrementa en relación con la extensión, la gravedad y el tiempo de evolución (61). La prevalencia de CCR en la colitis ulcerosa se incrementa de 3.7% al 5.4% si la afectación es pancolónica. La tasa de incidencia acumulada de CCR a lo largo de los años de enfermedad es del 2% a los 10 años, 8% a los 20 años y 18% a los 30 años (43).

1.6.5. Estudio de las vías de carcinogénesis

Actualmente el conocimiento molecular de las vías de carcinogénesis permite estudiar con más profundidad las bases moleculares implicadas en el desarrollo de tumores múltiples.

El estudio de los tumores sincrónicos supone un excelente modelo para examinar las alteraciones moleculares en la carcinogénesis del CCR, especialmente para conocer el sustrato que potencia la aparición de lesiones. (59)

La comparación del patrón genético de las diferentes lesiones sincrónicas puede aportar un importante conocimiento sobre la biología del tumor. La observación de

alteraciones moleculares aleatorias sugeriría que la asociación de dos tumores en el mismo paciente es fruto del azar. Sin embargo la observación de mutaciones relacionadas, podría apuntar a una etiología concreta que justificase la presentación de al menos dos tumores en el mismo paciente. (137).

2. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Se denomina CCR sincrónicos a los tumores que, siendo independientes, se diagnostican al mismo tiempo o en los primeros seis meses después del primer diagnóstico. Estos tumores comparten el mismo sustrato germinal y, a priori, la misma susceptibilidad a los agentes externos. Sin embargo, existen otros factores a nivel embriológico y fisiológico que pueden modular la susceptibilidad de los diferentes segmentos del colon a sustancias carcinogénicas, capaces de modificar el patrón molecular y por tanto las características de los tumores. Variaciones en el patrón molecular pueden ser determinantes en el diseño y la eficacia de la terapia oncológica

Teniendo en cuenta estas consideraciones se planteó la siguiente hipótesis:

“Los tumores sincrónicos de colon, no relacionados con factores hereditarios, comparten las mismas vías de carcinogénesis”

Para validar esta hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

1. Identificar las características anatómo-clínicas de los pacientes con CCR sincrónico no hereditario y sus diferencias respecto al patrón de distribución.
2. Caracterizar los tumores sincrónicos de cada individuo según la clasificación molecular, atendiendo a su estado de IMS y fenotipo CIMP.
3. Analizar la concordancia de las características moleculares de los diferentes tumores del mismo individuo y su variación en función del patrón de distribución.
4. Caracterizar el patrón de expresión de diferentes marcadores celulares, analizando su correlación tanto entre tumores como con los diferentes patrones de distribución.

3. MATERIAL Y METODOS

3.1. PACIENTES

3.1.1. Ámbito del estudio

El ámbito geográfico del estudio corresponde a pacientes inscritos en el Registro de Tumores del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid. Desde enero de 2005 se reclutaron 50 casos consecutivos con el diagnóstico de CCR que cumplieran los criterios de inclusión del estudio.

Criterios de inclusión: Pacientes con colonoscopia diagnóstica completa diagnosticados de CCR sincrónico; definiendo el CCR sincrónico como el diagnóstico simultáneo de varios adenocarcinomas invasivos.

Criterios de exclusión: Pacientes con carcinomas no invasivos, recurrencias locales, síndromes polipósicos asociados a mutaciones en *APC* o *MUTYH*, poliposis adenomatosas con más de 10 pólipos y pacientes diagnosticados de SL.

3.1.2. Información recogida.

Información clínica.

De cada uno de los casos incluidos en el estudio se recogió tanto información relacionada con el tumor como del paciente (Tabla 6):

Datos clínicos: Sexo y edad en el momento del diagnóstico.

Datos anatomo-patológicos de los tumores:

- Antecedentes oncológicos de los pacientes: tumores relacionados o no con SL.

DATOS ANATOMO-PATOLÓGICOS DE LOS TUMORES	
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR COLORRECTAL ^(*)	Derecha o proximal (desde el ciego hasta el ángulo esplénico)
	Izquierda o distal (desde el colon descendente hasta el sigma)
	Recto o unión recto-sigmoidea

PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES A LO LARGO DEL COLON	Colon derecho (PD-CD) (localización exclusiva en el colon derecho)
	Colon izquierdo (PD-CI) (localización exclusiva en el colon izquierdo y/o en el recto)
	Difuso (PD-D) (localización en colon derecho e izquierdo-recto)
GRADO HISTOLÓGICO DE DIFERENCIACIÓN CELULAR	Bien diferenciado
	Diferenciación moderada
	Pobremente diferenciado
PRODUCCIÓN DE MOCO	Patrón mucinoso
	Presencia de células en anillo de sello
ESTADÍO DE ASTLER-COLLER MODIFICADO	
CLASIFICACIÓN TUMORAL TNM	
PRESENCIA DE CCR METACRÓNICO EN EL SEGUIMIENTO	
PRESENCIA DE PÓLIPOS EN COLON ANTES O DESPUÉS DEL CCR	Tipo
	Número
NÚMERO DE TUMORES SINCRÓNICOS	
Tabla 6: Datos anatomo-patológicos. (*)A la hora de definir la localización general, se toma la del tumor con mayor estadio.	

Información familiar.

Una vez seleccionados los pacientes, se contactó con aquellos que habiendo sido diagnosticados de CCR, cumplieran los criterios de inclusión del estudio (*probandus* o caso índice). Se les propuso la participación en el estudio y se solicitó su autorización para la cesión de las muestras de los tumores para la investigación Biomédica (Anexo 1). En caso de fallecimiento, se contactó con un familiar de primer grado. En ambos casos, se concertó una entrevista en la que se recogieron datos referentes los antecedentes familiares relacionados con enfermedades neoplásicas.

A partir de la información que proporcionó el árbol genealógico se determinó si la familia cumplía o no los criterios clínicos de CCR familiar y/o hereditario. A partir de estos datos, se define al sujeto índice según sus antecedentes familiares como:

- Sospecha de SL, en aquellos casos en que se cumplen los criterios clínicos de Ámsterdam.
- Agregación familiar para neoplasias relacionadas con el SL, independientemente de la presencia o no de neoplasia no relacionadas con dicho síndrome.
- Agregación familiar para neoplasias no asociadas con el SL, cuando sólo existe agregación a dichas neoplasias, y al menos dos de ellas en familiares de primer grado.
- Esporádico, en el caso de que sea el único individuo de la familia que haya presentado un CCR y no hay antecedentes familiares de cánceres asociados al SL.

3.2. MATERIAL

3.2.1. Tejido incluido en parafina

Tras la cesión de las muestras para el estudio, se recogió el tejido tumoral conservado en parafina de cada uno de los *probandi*. Para la obtención de las mencionadas muestras, se contó con la colaboración del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid.

A partir de la muestra de tejido incluida en parafina se llevó a cabo tanto la inmunohistoquímica de los marcadores que más adelante se señalan como el análisis de la IMS. Es importante tener en cuenta que, antes de la extracción de ADN del tejido parafinado, se debe evaluar la proporción de células tumorales y normales. Este paso se realiza mediante una tinción con hematoxilina-eosina. Cuando los tejidos presentaban una proporción de células tumorales inferior al 70%, se separó el tejido

tumoral del sano, en dos bloques distintos para conseguir un enriquecimiento de la muestra en ADN procedente de células tumorales.

Tinción hematoxilina-eosina.

La tinción hematoxilina-eosina se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

- Realizar secciones del tejido con un espesor de 3 μm
- Incubar las secciones histológicas a 70°C durante 1 hora.
- Sumergir la muestra en xilol, con el objetivo de desparafinarla, durante 2 minutos, dos veces.
- Hidratar la muestra con etanol en dos fases; la primera con etanol absoluto durante 2 minutos, y la segunda, al 95% durante el mismo período de tiempo.
- Lavar con agua destilada otros dos minutos.
- Teñir los tejidos con hematoxilina de Mayer (15 minutos).
- Lavar con agua destilada otros dos minutos
- Contrastar la muestra con eosina durante 2 minutos.
- Lavar la muestra, para eliminar el exceso de colorante, con etanol al 70%.
- Deshidratar el tejido mediante pasos sucesivos en alcoholes de gradación creciente: etanol al 95% (30 segundos), etanol absoluto (2 minutos) y xilol (2 minutos, dos veces).
- Por último, montar las preparaciones histológicas con Eukitt® quick-hardening mounting médium (Sigma-Aldrich) o DPX.

Extracción del ADN de los tejidos

Para realizar la extracción del ADN de los tejidos embebidos en parafina se siguió el siguiente protocolo:

- Colocar tres cortes del tejido de 10 μm de espesor en un tubo de 1'5 cc.
- Desparafinar las muestras:
 - incubar los tejidos con 1 cc de xilol, 5 minutos a 65°C
 - centrifugar a 12.000 rpm 10 minutos
 - retirar el sobrenadante.

- Si todavía quedan restos de parafina, se repitirá el paso anterior
- Añadir 1 cc de etanol absoluto e incubar 5 minutos a 65°C.
- Centrifugar a 12.000 rpm 10 minutos y retirar el sobrenadante.
- Añadir 1 cc de etanol al 50%, e incubar 5 minutos a 65°C.
- Centrifugar a 12.000 rpm 10 minutos y retirar el sobrenadante.
- Dejar secar el tejido hasta que no queden restos de etanol.
- Añadir 400 µl de tampón (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8, 2'5 mM MgCl₂, 0'45% *Nonidet P40*, 4'5% *Tween 20*) y 40 µl (1/10 de volumen de tampón) de Proteinasa K (10 mg/ml) e incubar a 55°C, hasta no observar restos de tejido.
- Si pese a los pasos previos, y tras varias horas de incubación, quedan restos sin digerir, se debe añadir cantidades equivalentes de tampón y Proteinasa K, o centrifugar brevemente y separar el sobrenadante.
- Separar el sobrenadante en un tubo de purificación *Phase Lock Gel™ Light* (Eppendorf AG, Alemania) y se añadir un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1).
- Incubar en rotación durante 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente centrifugar a 12.000 rpm, 5 minutos.
- Recuperar la fase acuosa (superior), pasarla a un tubo nuevo *Phase Lock Gel™ Light* y añadir un volumen (440 µl) de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1). Una vez hecho esto, repetir el paso previo.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo de 1'5 cc y añadir en un volumen (440 µl) de cloroformo.
- Incubar de nuevo en rotación, centrifugar y recoger la fase acuosa en un tubo de 1'5 cc.
- Añadir 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto frío. A continuación, precipitar el ADN a -20°C durante toda la noche.
- Centrifugar a 12.000 rpm, 15 minutos a 4°C y se retirar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de etanol frío al 75%.

- Centrifugar 12.000 rpm, 10 minutos a 4°C, retirar el sobrenadante y dejar secar para eliminar los restos de etanol. Por último, resuspender el botón de ADN en TE (pH 8) o en agua destilada estéril.

Valoración de la cantidad y calidad del ADN

Una vez obtenido el ADN, es esencial la comprobación la integridad y calidad del mismo, mediante la electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. El proceso se describe a continuación:

- Preparación del gel de agarosa 1%:
 - En un matraz de 250 ml añadir 1,5 gr de agarosa (Agarosa media, Pronadisa, Laboratorios Conda, Madrid) y 150 ml de tampón TBE 1X (Tris, ácido bórico, EDTA), y llevarlo a ebullición en un microondas hasta que se funda la agarosa.
 - Dejar atemperar y añadir 4 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml).
 - Verter la disolución en una bandeja apropiada, sellada por los extremos con cinta adhesiva y colocar un peine cerca del borde, donde quedarán los pocillos de carga.
 - Dejar solidificar el gel
 - Retirar la cinta adhesiva y el peine, colocar el gel en una cubeta de electroforesis horizontal (Laboratorios Bio-Rad, High Wycomb, Gran Bretaña) y cubrir con TBE 1X
- Cargar en los pocillos del gel 2 µl de muestra mezclado con tampón de carga (glicerol, azul de bromofenol, xilencianol), conectar una fuente de alimentación a la cubeta y dejar migrar las muestras
- Visualizar el gel en un transiluminador de luz ultravioleta (GelDoc 2000, Biorad, High Wycomb, Gran Bretaña)

La concentración y la pureza del ADN se cuantificó en Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

3.3. ESTUDIO DE INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES EN TEJIDO NORMAL

3.3.1. Panel de Bethesda

El denominado “panel de Bethesda” se recomienda actualmente para la determinación del estado de IMS en los tumores sospechosos de SL (14). Incluye el estudio de cinco microsatélites: BAT25, BAT26, D5S346 (APC), D17S250 (Mfd15CA) y D2S123. El estudio se llevó a cabo por el Dr. Daniel Rueda en el Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Universitario 12 de Octubre, de Madrid.

Para realizar este estudio se utilizó un ensayo de PCR *multiplex* (*HNPCC Microsatellite Instability Test*, Roche, Mannheim, Alemania) capaz de generar productos marcados con fluorescencia que posteriormente son analizados en un secuenciador *ABI* automático (Tabla 7).

Marcador microsatélite	Localización cromosómica (gen próximo a marcador)	Tamaño del producto de PCR (pb)	Fluorescencia
BAT25	4q12 (c-kit)	110-130	6-FAM
BAT26	2p16.3-p21 (hMSH2)	100-120	TET
D5S346	5q21/22 (APC)	100-130	HEX
D17S250	17q11.2-q12 (BRCA1)	140-170	TET
D2S123	2p16 (hMSH2)	200-230	6-FAM

Tabla 7: Tamaño de los productos de PCR y fluorocromos empleados para el análisis de la IMS mediante el “panel de Bethesda” (HNPCC Microsatellite Instability Test, Roche).

Para la realización de la PCR multiplex, se partió de ADN tumoral y normal extraído de tejidos incluidos en bloques de parafina y se siguieron las recomendaciones del fabricante: **Reacción de PCR para un volumen final de 25 µl**

ADN del tejido tumoral parafinado (200 ng)	X µl
<i>Multi Primer Mix</i>	5 µl
<i>Enzyme Master Mix</i>	5 µl
H ₂ O destilada libre de nucleasas	Y µl (hasta 25 µl)
Tabla 8: Condiciones de la PCR multiplex	

La reacción se realizó en un termociclador *GeneAmp® 9700* (Perkin-Elmer, PE Applied Biosystems) y en las siguientes condiciones:

Número de ciclos	Temperatura	Tiempo
1	94°C	2 min
35	94 °C	30 seg
	55°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72 °C	7 min
Tabla 9: Preparación de la mezcla para la PCR multiplex		

Tras la realización de la PCR multiplex, se prepararon las muestras para su posterior análisis: 12 µl de formamida desionizada, 0'1 µl de un marcador de tamaño marcado con TAMRA (TAMRA 500) y 1 µl del producto de PCR. Esta mezcla se analizó en un secuenciador *ABI Prism 3700* (PE Applied Biosystems) y se visualizan los resultados mediante el software *GeneScan 3.5*. Se consideró IMS cuando, dentro del panel de Bethesda, había 2 o más de loci que presentaban modificaciones en su secuencia. El resto de casos se definieron como EMS.

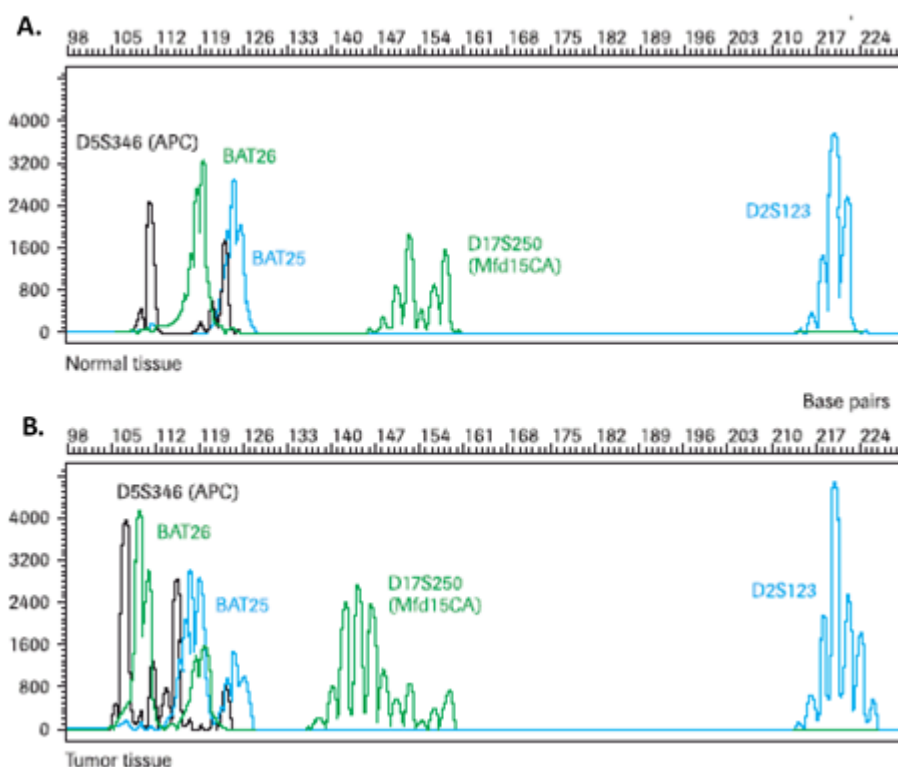


Figura 13: Resultado de la amplificación del ADN normal (A) y de un tumor (B) que muestra IMS en todos los marcadores microsatélites analizados.

3.4. ANÁLISIS DEL FENOTIPO METILADOR DE ISLOTES CPG.

En el panel de metilación CIMP se incluyeron los promotores de los siguientes genes: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1* (142)(196). El análisis se realizó mediante la técnica de “*methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*” (MS-MLPA) (139), usando el kit comercial SALSA MLPA (ME042-B1, MRC-Holland) y siguiendo el procedimiento recomendado por el distribuidor. Los productos de MS-MLPA fueron analizados mediante electroforesis capilar en el analizador automático 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) y los picos consiguientes examinados usando el software Genemapper v3.5.

El índice de metilación de los locus CpG específicos se calculó dividiendo el área normalizada de una muestra sonda digerida por la enzima HhaI y su equivalente no digerido. El FM-Alto (fenotipo metilador-alto) se definió como la presencia de $\geq 6/8$

promotores de genes metilados, FM-Bajo cuando presentaba de 1/8 a 5/8 promotores de genes metilados, mientras que el FM-0 resultó de la ausencia (0/8) de promotores de genes metilados (144).

3.5. CONSTRUCCIÓN DE MICROMATRICES DE TEJIDO.

La construcción de micromatrices de tejido fue realizada en la por el servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre (Dra. Yolanda Rodríguez) a partir de las muestras de tejido en parafina. Se eligieron los tejidos más adecuados en relación a la profundidad tisular (más de 2 mm) y a la correcta preservación antigénica tras el proceso de fijación. A partir de las tinciones con hematoxilina-eosina (HE) de cada bloque, se seleccionaron aquellas áreas de la muestra con mejores condiciones tumorales.

De todas las muestras se obtuvieron dos cilindros de 1 mm de diámetro de distintas zonas. Estos cilindros se transfirieron de forma precisa a un nuevo bloque de parafina mediante una estación de trabajo de matrices de tejido (Beecher Instruments, Silver Spring, MD) (93). Además del tejido en estudio, se incluyen, también por duplicado, cilindros de diferentes tejidos (epitelio normal contiguo al tumor y tejido de la amígdala reactiva de referencia) que sirven de control positivo para la tinción de los diferentes anticuerpos utilizados. En la Figura 14.A se muestra una matriz de tejido.

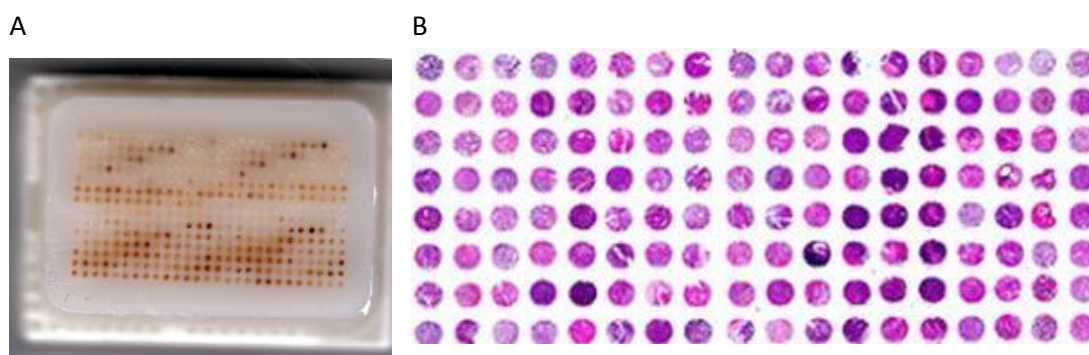


Figura 14: A) Micromatriz de tejido. Tomado de <http://tissuearray.org/yale/tisarray.html>. B) Tinción HE de una sección de una de las matrices de tejido incluidas en el estudio.

Una vez construidas las matrices, se realizaron secciones mediante un micrótopo. Una de ellas, por medio de una tinción HE, sirvió de confirmación de que todas las muestras incluidas se hallaban en la matriz (Figura 14.B). Los demás cortes se utilizaron para las hibridaciones inmunohistoquímicas y el resto de los estudios. Es necesario destacar que, para evitar pérdidas o escasez de muestra de tejidos, todas las muestras se pusieron por duplicado.

3.6. INMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ).

Las hibridaciones inmunohistoquímicas, con los anticuerpos seleccionados, se realizaron en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Universitario 12 de Octubre.

Se cortaron secciones de 2 μ m del tejido fijado en formol e incluido en parafina; se desparafinaron durante 12 horas en estufa a 55°C y se hidrataron mediante pases sucesivos de alcoholes: 10 minutos en xileno (2 veces), 5 minutos en etanol absoluto, 5 minutos en etanol 95%, 5 minutos en etanol 70% y 2 minutos en agua destilada.

El desenmascaramiento se llevó a cabo en una olla a presión utilizando como tampón de desenmascaramiento o recuperación antigénica, citrato sódico 10 mmol a pH 5.6 durante 3 minutos. A continuación se realizó la inactivación de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% (solución bloqueante S2023, DAKO, Glostrup, Dinamarca), durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Después de la incubación con el anticuerpo primario (Tabla 10), la inmunodetección se realizó mediante incubación con inmunoglobulinas anti-ratón y anti-conejo (anticuerpo secundario) unidas a la enzima peroxidasa que, tras una posterior incubación con el sustrato diaminobenzidina, produce una reacción cuyo producto, de color marrón, es visible al microscopio óptico. Todas las tinciones IHQ fueron llevadas a cabo mediante el robot automatizado *TechMate 500* (DAKO).

Por último, se contratiñeron las secciones con hematoxilina de Harry, se lavaron y deshidrataron a través de sucesivos pases por alcoholes: 30 segundos en etanol al 95%, 30 segundos en etanol absoluto, 10 minutos en xileno.

	Marcador	CLON	Casa comercial
Proteínas del sistema de reparación	MLh1	G168-15	BD PharMingen
	Msh2	FE11	Oncogene
	Msh6	44	BD Transduction Lab.
Moléculas implicadas en adhesión celular	β -catenina	14	BD Transduction Lab.
	E-cadherina	4A2C7	Zymed
Marcadores de ciclo celular	p16	F-12	Santa Cruz
	p21 (WAF1)	EA10	Oncogene
	p27	57	BD Transduction Lab.
Proliferación celular	p53	DO-7	Novocastra
	Ki-67	MIB-1	DAKO
Otros	CK 20	Ks20.8	DAKO
	SMAD4	B8	Santa Cruz

Tabla 10: Marcadores, clones y casas comerciales de los anticuerpos utilizados en la técnica de IHQ en cortes de tejido incluido en parafina.

Selección de marcadores

La elección de marcadores para el estudio IHQ se llevó a cabo de acuerdo a dos criterios. Por una parte, tomando como referencia los datos descritos en la literatura, y por otra, debido al interés en relación con su implicación en rutas o procesos importantes en el desarrollo del CCR.

Proteínas del sistema de reparación: MLh1, Msh2, Msh6.

Como se ha señalado previamente en la Introducción, existen numerosos estudios que muestran que el análisis IHQ utilizando anticuerpos para detectar las proteínas MLh1, Msh2 y Msh6 es un método útil para identificar portadores de mutación en los genes de reparación(12)(133) (73). De igual manera, también se ha indicado que esta técnica *per se* no es suficiente para la selección de casos para el estudio de los genes de reparación, siendo necesaria la utilización de otros estudios o criterios, como son la IMS y los criterios clínicos de Ámsterdam y Bethesda (133)(111).

Marcadores de ciclo celular, adhesión, proliferación, apoptosis, y otros.

En las matrices de tejido se estudiaron marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular Tabla 11. A continuación, en la Tabla 12 se recogen los marcadores estudiados, relacionados con la adhesión celular. En la tabla Tabla 13 se observa las moléculas relacionadas con la proliferación celular. En la Tabla 14 se recogen otros marcadores de interés en el CCR.

Marcadores de ciclo celular	PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES
p16 ^{INK4}	Inhibidor de Cdk4/6 (173) Inhibe la fosforilación de RB (160)
p21WAF1/Cip1	Activada por p53, inhibe a Cdk2, induciendo la parada del ciclo celular en la fase G1, para que se produzca la reparación del ADN o la apoptosis (91) Existe actividad de p21 independiente de p53. (91, 117)
p27	Inhibidor de Cdk2. Induce la parada del ciclo en G1. Su nivel de expresión se regula post-transcripcionalmente a través del proteosoma(112).

Tabla 11: Marcadores moleculares relacionados con el ciclo celular seleccionados para el estudio IHQ en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.

Moléculas implicadas en adhesión celular	PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES
E-cadherina	Glicoproteína de membrana crítica para el control de la adhesión celular y la polaridad de los epitelios. Unida al citoesqueleto se activa a través de interacciones con las cateninas (180)
β-catenina	Se localiza en la membrana citoplasmática, formando parte de un complejo con APC, axina y GSK-3β. Cuando el complejo no se forma correctamente, se activa la vía de Wnt y aumenta la cantidad de β-catenina en el citoplasma, siendo transportada y acumulada en el núcleo (130).

Tabla 12: Moléculas implicadas en adhesión celular seleccionadas para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.

Moléculas implicadas en proliferación celular	PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES
p53	Regula la transcripción de numerosos genes y es crucial para el mantenimiento de la parada del ciclo celular, la regulación de la reparación del ADN, la diferenciación y la apoptosis (205)
Ki-67	Antígeno nuclear que está presente sólo en las células en proliferación(53).

Tabla 13: Moléculas implicadas en la proliferación celular seleccionadas para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares.

Otros marcadores	PAPEL EN LOS PROCESOS CELULARES
CK20	Se expresa en el epitelio colorrectal normal y en la mayoría (70-100%) de los CCR, por lo que se emplea como indicador IHQ de CCR, y de forma rutinaria para evaluar las metástasis de origen desconocido(163).
SMAD4	Interviene en la vía de señalización de TGF- β , suprimiendo el crecimiento epitelial(11).

Tabla 14: Otros marcadores seleccionados para el estudio inmunohistoquímico en las matrices de tejido. Se indica su función en los procesos celulares

Valoración de los marcadores.

El porcentaje de núcleos teñidos, independientemente de la intensidad, fue contabilizado para β -catenina, Ki-67, p16, p21, p27, p53. En el caso de β -catenina, Citoqueratina 20 y E-cadherina, lo que se contabilizó fue el porcentaje de células con tinción citoplasmática o de membrana. A la hora de llevar a cabo los análisis categóricos, partiendo de los porcentajes de cada uno de los marcadores IHQ, se calculó la mediana y se consideraron positivos aquellos valores superiores a ella y negativos los casos con porcentajes menores a la mediana.

En el caso de las proteínas de reparación del ADN, Mlh1, Msh2 y Msh6, los casos se consideraron positivos o negativos según la presencia o ausencia de expresión de dichas proteínas.

3.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

A la hora de realizar el estudio descriptivo, las variables cualitativas vienen expresadas por el número de casos (n), así como por el porcentaje respecto al total de casos de la variable en cuestión. En relación a las variables cuantitativas, vienen expresadas mediante la media y la desviación estándar.

Para comparar las características familiares, clínico-patológicas, genéticas e inmunohistoquímicas entre las diferentes categorías dentro de cada grupo y entre los grupos de “Localización”, se utilizó la prueba de Chi cuadrado (χ^2) de Pearson para variables categóricas, o bien el test exacto de Fisher (test no paramétrico). Para la valoración de la concordancia de variables cualitativas se utilizó el índice kappa (κ). Para la valoración de la correlación de variables cuantitativas se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Las variables continuas se compararon mediante la prueba de T de Student para muestras independientes. Se realizó la prueba estadística de ANOVA (variables continuas) para en aquellos casos en los que se compararon variables continuas de más de dos categorías. Para la realización de estas pruebas se utilizó el programa estadístico *SPSS v.17.0* para *Windows* (Chicago, Illinois, EEUU).

Las diferencias fueron consideradas significativas cuando el valor de p asociado a la prueba estadística de contraste era menor de 0'05.

4. RESULTADOS

4.1. ESTUDIO DESCRIPTIVO DE LA MUESTRA

4.1.1. Variables anatómico-clínicas

Se han estudiado un total de 50 pacientes diagnosticados de CCR sincrónico; la mayoría de ellos eran hombres (66%) con un rango de edad de entre los 45 y los 91 años, y una edad media en el momento del diagnóstico de 71,24 (9,8) años. Las variables epidemiológicas se describen en la Tabla 15.

Datos epidemiológicos de los pacientes diagnosticados de CCR sincrónico			
Número de pacientes		50	
Distribución por sexo	Hombres	33 (66%)	p<0,001
	Mujeres	17 (34%)	
Edad media al diagnóstico		71,24 (±9,8) años	

Tabla 15 características epidemiológicas de la población

El tiempo medio libre de enfermedad fue de 19,61 (12,7) meses y la media de supervivencia global fue de 68, 41 (10,1) meses. Durante el seguimiento de los pacientes se produjeron nueve fallecimientos

Desde el punto de vista de los antecedentes familiares, ninguno de los pacientes cumplía criterios de Ámsterdam. El 78% de los CCR eran casos esporádicos, mientras que en 11 (22%) existía algún tipo de agregación familiar. De estos 11 pacientes, 4 de ellos habían sido diagnosticados previamente de tumores relacionados con SL, mientras que los otros 7 presentaban tumores no incluidos en la esfera Lynch.

En 45 pacientes (90%) se detectaron antecedentes de polipectomías asociadas. La media de pólipos resecados por paciente fue de 5,12 (± 3,8) siendo la mayoría adenomatosos 62,2%, frente a 37,8% de tipo hiperplásico.

En cuanto a la histología de los tumores, el 22% de los pacientes presentaba tumores con producción de mucina mientras que el 4% tenía presencia de células en anillo de

sello. En la Tabla 16 se muestran los resultados de la estadificación tumoral de los pacientes según los criterios de la AJCC y de Astler-Coller modificada.

ESTADIFICACIÓN TUMORAL DE LOS PACIENTES			
CLASIFICACIÓN AJCC		CLASIFICACIÓN Astler-Coller	
A	14 (28,0%)	In situ	1 (2,0%)
B	22 (44,0%)	A	13 (26,0%)
C	11 (22,0%)	B1	6 (12,0%)
D	6 (6,0%)	B2	16 (32,0%)
		C2	10 (20,0%)
		D	4 (8,0%)

Tabla 16 Estadio de los tumores de los pacientes según los criterios de la AJCC y la clasificación de Astler-Coller modificada.

En total se detectaron un total de 125 tumores; el 30% de los pacientes presentaba más de 2 tumores en el momento del diagnóstico. Desde el punto de vista individual, la localización más frecuente fue en recto (44%) seguida de colon derecho (CD) (36,8%) y colon izquierdo (CI) (19,2%).

Como se ha mencionado en Material y Métodos, para la estadificación de los tumores de los pacientes se tuvo en cuenta el tumor de mayor tamaño. Cuando se considera el tumor que definía el estadio, las localizaciones más frecuentes fueron CD y recto con 20 (40%) y 21 (42%) pacientes respectivamente, mientras que en sólo 9 pacientes (18%) se localizaba en CI (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

LOCALIZACIÓN DEL TUMOR DEFINITORIO DEL ESTADIO		n/(%)
PROXIMAL	Colon derecho	20 (40)
DISTAL	Colon izquierdo	9 (18)
	Recto	21 (42)

Tabla 17: Localización de los tumores que definen el estadio y su distribución por segmentos

En cuanto al patrón de distribución de los tumores, 22 pacientes (44%), presentaban lesiones tanto a nivel proximal como distal al ángulo esplénico (distribución difusa, PD-D). Los otros 28 (56%), presentan un patrón de distribución segmentario, con tumores exclusivamente en colon izquierdo (PD-CI) (42%) o en colon derecho (PD-CD) (14%) (Tabla 18).

PATRONES DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TUMORES RESPECTO AL ÁNGULO ESPLÉNICO		n (%)	Total n (%)
Distribución segmentaria	Colon derecho (PD-CD)	7 (14)	28 (56)
	Colon izquierdo (PD-CI)	21 (42)	
Distribución difusa (PD-D)			22 (44)

Tabla 18: Patrón de distribución de los tumores de cada individuo respecto al ángulo esplénico

4.1.2. Descripción de las variables anatomo-clínicas en función del patrón de distribución

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación al sexo (Tabla 19) y edad media de los pacientes (Tabla 20) respecto a los diferentes patrones de distribución.

SEXO	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)	p valor
Varón	3/7 (42,9%)	17/21 (81,0%)	13/22 (59,1%)	n.s.
Mujer	4/7 (57,1%)	4/21 (19,0%)	9/22 (40,9%)	

Tabla 19. Proporción de hombres y mujeres en función del patrón de distribución a lo largo del colon

	PD-CD	PD-CI	PD-D	p valor
Edad media (DE)	72,5 (9,4)	71,1 (8,8)	70,9 (11,1)	n.s.

Tabla 20. Edad media de los pacientes en función del patrón de distribución de los tumores.

Se observó que sólo el 57,1% de los pacientes con PD-CD presentaban pólipos durante el seguimiento, frente al 95,2% y 95,5% de los que presentaban PD-CI y PD-D respectivamente ($p=0,016$). Sin embargo la media de pólipos resecados fue similar en todos los patrones de distribución (Tabla 21).

La proporción de pólipos hiperplásicos fue superior en PD-CD (50%), frente a PD-CI (35%) y PD-D (38,1%), si bien estas diferencias no fueron estadísticamente significativas.

En relación a la producción de mucina, se encontraron diferencias estadísticamente significativas; 57% de las neoplasias con PD-CD frente al 4,8% y 27,3% en aquellas con PD-CI y PD-D respectivamente ($p=0,009$).

No se encontraron diferencias significativas en el estadio tumoral en función de los patrones de distribución.

En el seguimiento realizado se apreció que 5 pacientes con CCR sincrónico presentaron tumores de colon metacrónicos. El tiempo medio que transcurrió entre el diagnóstico inicial y la aparición del tumor metacrónico fue de 22,8 ($\pm 10,82$) meses, con un rango comprendido entre 10 y 32 meses. De los pacientes con tumores metacrónicos, cuatro (80%) presentaban un PD-CI, uno PD-D mientras que ninguno de los pacientes presentaba un PD-CD (Tabla 21).

	CCR total n (%)	PD-CD n (%)	PD-CI n (%)	PD-D n (%)	p valor
Pacientes	50	7	21	22	
Pólipos en el seguimiento					
Media de pólipos	45 (90)	4 (57,1)	20 (95,2)	21 (95,5)	0,016
Tipos de pólipos:	5,12 (3,8)	4,8 (4,7)	5 (4,4)	5,3 (2,9)	n.s.
• Adenomatosos	28 (62,2)	2 (50)	13 (65)	13 (61,9)	n.s.
• Mixtos (hiperplásicos)	17 (37,8)	2 (50)	7 (35)	8 (38,1)	n.s.
Producción de mucina	11 (22)	4 (57,1)	1 (4,8)	6 (27,3)	0,009
Células en anillo de sello	2 (4)	1 (14,3)	0	1 (4,5)	n.s.
Astler Collier modificado:					
• A	14 (28)	0	7 (33,3)	7 (31,8)	n.s.
• B	22 (44)	6 (85,7)	8 (38,2)	8 (36,4)	
• C	11 (22)	0	4 (19)	7 (31,8)	
• D	3 (6)	1 (14,3)	2 (9,5)	0	
Tumores metacrónicos	5 (12)	0	4 (23,8)	1 (4,5)	n.s.

Tabla 21 : Frecuencia de variables anatómo-patológicas y estadio de toda la muestra. n.s.: no estadísticamente significativo

4.2. ANÁLISIS DE LAS VÍAS DE CARCINOGENÉISIS

4.2.1. Estudio de vía metiladora

Estudio del fenotipo metilador

Se realizó el estudio del fenotipo metilador en 49 de los 50 pacientes. Sólo uno de los pacientes no presentaba marcadores de metilación en ninguno de los tumores (CIMP-0), mientras que 48 (97,9%) pacientes presentaban cierto grado de metilación en sus tumores. De ellos, el 65,3% de los pacientes tenían un estado de metilación alto (CIMP-H) en al menos uno de los tumores.

El estudio del patrón de metilación en relación con el sexo mostró un mayor porcentaje de hombres, con al menos un tumor con fenotipo CIMP-H (75%), frente al 47,1% de mujeres (Figura 15). Estas diferencias fueron significativas desde el punto de vista estadístico ($p=0,05$).

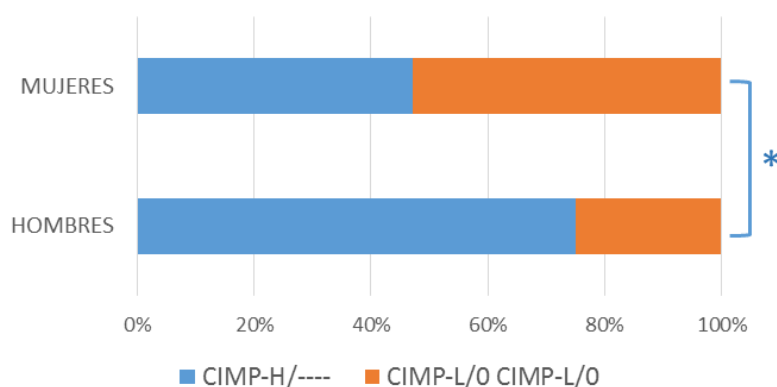


Figura 15. Patrón del nivel de metilación de los tumores en función del sexo de los pacientes (* $p=0,05$)

Al comparar el nivel de metilación y el grado de diferenciación de los tumores se observó una asociación negativa entre ambas variables ($p=0,042$) (Tabla 22).

		Ambos CIMP-0/L	Mixto	Ambos CIMP-H	p valor
Grado de diferenciación	• Alto	11 (100,0%)	5 (55,6%)	6 (54,5%)	0,042
	• Medio	0 (0,0%)	2 (22,2%)	4 (36,4%)	
	• Bajo	0 (0,0%)	2 (22,2%)	1 (9,1%)	
Afectación ganglionar		2 (11,8%)	2 (14,3%)	7 (46,7%)	0,054
Presencia de metástasis		0 (0,0%)	1 (6,7%)	3 (18,8%)	n.s.

Tabla 22 Resumen de las variables anatómo-clínicas más relevantes respecto al nivel de metilación de los tumores sincrónicos.

Los resultados del estudio muestran tendencia a la asociación ($p=0,054$) entre el grado de metilación y la presencia de ganglios afectados (Tabla 22). El 18% de los pacientes con CIMP-H en los dos tumores presentaban mayor número de metástasis, mientras que ninguno de los pacientes con CIMP-0/L en sus dos tumores las desarrolló.

No se han observado diferencias en el estadio de Astler-Coller, ni en el estadio TNM, en función del patrón de metilación de los tumores CCR. No se han observado diferencias en el número de pólipos asociados en relación con el patrón de metilación de los tumores.

El patrón de metilación CIMP-H-CIMP-H fue más frecuente en aquellos pacientes que desarrollaron posteriormente tumores metacrónicos (60% vs. 31%). Todos los pacientes con tumores metacrónicos presentaban CIMP-H en, al menos, uno de los tumores frente al 63,4% de los pacientes que no desarrollaron tumores metacrónicos ($p>0,05$) (Tabla 23).

		Ambos CIMP-0/L	Mixto	Ambos CIMP-H	p valor
Tumores metacrónicos	Presencia	0%	40%	60%	n.s.
	Ausencia	38%	31%	31%	n.s.

Tabla 23. Desarrollo de tumores metacrónicos en función del patrón de metilación.

Se analizó la concordancia del grado de metilación entre los dos tumores del mismo individuo observándose una nivel de concordancia moderado ($\kappa=0,44$) (Tabla 24).

		TUMOR 2	
		CIMP-0/L	CIMP-H
TUMOR 1	CIMP-0/L	17 (34,7%)	15 (30,6%)
	CIMP-H	0 (0,0%)	17 (34,7%)

Tabla 24. Patrón de metilación en tumores sincrónicos $\kappa=0,44$.

Valoración del fenotipo metilador en función del patrón de distribución

Al comparar el patrón de distribución de los tumores en función del fenotipo metilador de los mismos, se observó una mayor frecuencia del fenotipo CIMP-H en tumores con PD-CI (76,1%), frente al 57% tanto en tumores con PD-CD como tumores con PD-D. En los tumores con PD-CI se encontró una mayor proporción de parejas de tumores CIMP-H (CIMP-H-CIMP-H) ($p>0,05$) (Tabla 25).

Patrones de distribución	Ambos CIMP-0/L	Mixto	Ambos CIMP-H	p valor
PD-CD	42,9%	42,9%	14,3%	n.s.
PD-CI	23,8%	33,3%	42,9%	
PD-D	42,9%	23,8%	33,3%	

Tabla 25. Patrón de metilación de los tumores en función del patrón de distribución

Posteriormente se analizó la concordancia, a nivel de metilación, de los tumores de un mismo paciente en función del patrón de distribución. Se consideraron tumores concordantes aquellos que pertenecían al mismo paciente y presentaban el mismo CIMP. Se observó un nivel de concordancia moderado en PD-D. La concordancia en los tumores con PD-CD y PD-CI fue débil. (Tabla 26).

Patrones de distribución	Pacientes con tumores concordantes	Índice κ
PD-CD	57,1%	0,22
PD-CI	66,7%	0,38
PD-D	76,2%	0,55

Tabla 26. Concordancia del nivel de metilación de los tumores en función de su patrón de distribución.

Estudio de metilación de genes de forma individual

Se estudió el patrón de metilación de los genes *CACNA1G*, *CKDN2A*, *MLH1*, *NEUROG1* y *SOCS1* y su relación con las diferentes variables anatómo-clínicas.

Gen CACNA1G

Los pacientes con metilación del gen *CACNA1G* en ambos tumores (+/+) presentaron mayor frecuencia de metástasis ($p=0,106$), afectación linfática ($p=0,057$), persistencia de la enfermedad ($p=0,051$) y muerte relacionada con CCR ($p=0,060$) (Tabla 27).

Gen CKDN2A

Un patrón de metilación del gen *CKDN2A* (-/-) se relacionó con el desarrollo de tumores con un alto grado de diferenciación ($p=0,118$). El 80% de los pacientes que desarrollaron tumores metacrónicos presentaron un patrón de metilación de *CDKN2A* (+/+) frente a aquellos con un patrón de metilación (-/+) (20%) o (-/-) (0%) ($p>0,05$). Todos los pacientes que desarrollaron en la evolución tumores metacrónicos presentaron metilación del gen *CDKN2A* en al menos uno de los tumores ($p>0,05$) (Tabla 27).

Gen MLH1

En 35 de los pacientes estudiados se observó metilación del gen *MLH1* en, al menos, uno de los tumores de los cuales, 17 (48,6%) presentaban un patrón de metilación (+/+). Aquellos pacientes con metilación del gen *MLH1* en al menos uno de los tumores, presentaban una diferenciación tumoral moderada o baja ($p=0,033$). Un patrón de metilación (+/+) es más frecuente en aquellos pacientes que desarrollan tumores metacrónicos (60%), aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p>0,05$) (Tabla 27).

Gen NEUROG1

Tras analizar el patrón de metilación del gen *NEUROG1*, se observó que el fenotipo (+/+) estaba relacionado con una mayor presencia de metástasis ($p=0,062$) y una

mayor persistencia de la enfermedad en el seguimiento ($p>0,05$); sin embargo estos resultados no fueron estadísticamente significativos (Tabla 27).

Gen *SOCS1*

El patrón de metilación (+/+) del gen *SOCS1* se asoció, de manera estadísticamente significativa, con el desarrollo de metástasis ($p=0,002$) y presentó una asociación cercana a la significación con la persistencia de la enfermedad ($p=0,083$) y el estadio de Astler-Coller ($p=0,062$). Así mismo, este patrón de metilación fue más frecuente en aquellos pacientes que posteriormente desarrollaron tumores metacrónicos ($p=0,097$) (Tabla 27).

GEN	PATRÓN DE METILACIÓN	VARIABLES ANATOMO-CLINICAS ASOCIADAS
CACNA1G	(+/+)	Desarrollo de metástasis ($p=0,106$) Afectación ganglionar ($p=0,057$) Persistencia de la enfermedad ($p=0,051$) Muerte relacionada con CCR ($p=0,060$)
CKDN2A	(-/-)	Grado de diferenciación tumoral alto (n.s)
	(-/+)	Grado de diferenciación tumoral bajo/moderado (n.s)
	(+/+)	
MLH1	(-/-)	Grado de diferenciación tumoral alto (n.s)
	(-/+)	Grado de diferenciación tumoral bajo/moderado (n.s)
	(+/+)	
NEUROG1	(-/+)	Desarrollo de metástasis ($p=0,062$) Persistencia de enfermedad ($p=0,149$)
SOCS1	(+/+)	Desarrollo de metástasis ($p=0,002$) Persistencia de enfermedad ($p=0,083$) Mayor estadio Astler-Coller ($p=0,062$) Tumores metacrónicos ($p=0,097$)

Tabla 27. Resumen de las variables anatómo-clínicas en función de la metilación individual de los genes del panel de metilación CIMPA. Análisis de la metilación de genes individualmente respecto al patrón de distribución

Gen *CKDN2A*

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grado de metilación del gen *CKDN2A* y el patrón de distribución de los tumores estudiados. Sin

embargo, cabe señalar que un alto porcentaje de tumores sincrónicos con PD-CI presentaban un patrón de metilación (+/+) (76,2%), frente a los pacientes con tumores con PD-CD (57%) o PD-D (47,6%) ($p=0,065$) (Tabla 28).

El 96,4% de los pacientes con los tumores de distribución segmentaria presentaban metilación de al menos uno de los tumores; estos resultados fueron estadísticamente significativos ($p=0,015$). Se analizó la concordancia de la metilación del gen *CKDN2A* en función del patrón de distribución no observándose diferencias estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Patrón de metilación del gen <i>CKDN2A</i>	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)
(-/-)	0 (0,0%)	1 (4,8%)	7 (33,3%)
(-/+)	3 (42,9%)	4 (19,0%)	4 (19,0%)
(+/+)	4 (57,1%)	16 (76,2%)	10 (47,6%)

Tabla 28 Patrón de metilación de *CKDN2A* en tumores sincrónicos en función del patrón de distribución

Gen *IGF2*

El patrón global metilación del gen *IGF2* no se vio afectado por los diferentes patrones de distribución de los tumores. Sin embargo, el nivel de concordancia entre los tumores si mostró diferencias estadísticamente significativas en relación con el patrón de distribución. Los pacientes que presentaban tumores con PD-D, presentaban mayor concordancia (76,2%) que los pacientes con tumores con distribución segmentaria (46,4%) ($p=0,045$) (Tabla 29).

Patrón de metilación del gen <i>IGF2</i>	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)
(-/-)	2 (28,6%)	4 (19,0%)	9 (42,9%)
(-/+)	5 (71,4%)	10 (47,6%)	5 (23,8%)
(+/+)	0 (0,0%)	7 (33,3%)	7 (33,3%)

Tabla 29. Patrón de metilación de IGF2 respecto al patrón de distribución

Genes MLH1, CACNA1G, CRABP1, NEUROG1 y RUNX

Como se observa en las Tabla 30 y Tabla 31, no hubo diferencias estadísticamente significativas del patrón de metilación del resto de genes del panel CIMP, respecto al patrón de distribución.

Patrón de metilación del gen <i>MLH1</i>	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)
(-/-)	2 (28,6%)	5 (23,8%)	7 (33,3%)
(-/+)	4 (57,1%)	8 (38,1%)	6 (28,6%)
(+/+)	1 (14,3%)	8 (38,1%)	8 (38,1%)

Patrón de metilación del gen <i>CACNA1G</i>	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)
(-/-)	3 (42,9%)	7 (33,3%)	6 (28,6%)
(-/+)	3 (42,9%)	5 (23,8%)	9 (42,9%)
(+/+)	7 (14,3%)	9 (42,9%)	6 (28,6%)

Patrón de metilación del gen <i>CRABP1</i>	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21) n (%)
(-/-)	1 (14,3%)	5 (23,8%)	4 (19,0%)
(-/+)	3 (42,9%)	6 (28,6%)	3 (14,3%)
(+/+)	3 (42,9%)	10 (47,6%)	14 (66,7%)

Tabla 30 Patrón de metilación de MLH1, CACNA1G, CRABP1 respecto al patrón de distribución de los tumores de CCR (p>0,05 para todas las comparaciones).

Patrón de metilación del gen NEUROG1	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21n) (%)
(-/-)	1 (14,3%)	2 (9,5%)	5 (23,8%)
(-/+)	3 (42,9%)	10 (47,6%)	7 (33,3%)
(+/+)	3 (42,9%)	9 (42,9%)	9 (42,9%)

Patrón de metilación del gen RUNX3	PD-CD (n=7) n (%)	PD-CI (n=21) n (%)	PD-D (n=21n) (%)
(-/-)	3 (42,9%)	4 (19,0%)	6 (28,6%)
(-/+)	3 (42,9%)	7 (33,3%)	9 (42,9%)
(+/+)	1 (14,3%)	10 (47,6%)	6 (28,6%)

Tabla 31. Patrón de metilación de **NEUROG1** y **RUNX3** respecto al patrón de distribución de los tumores de CCR ($p>0,05$ para todas las comparaciones).

4.2.2. Análisis de la inestabilidad de microsatélites

En el estudio se observó que sólo 3 de los 50 pacientes presentaron tumores con IMS. Un paciente presentaba IMS en los dos tumores analizados, ambos tumores presentaban un fenotipo de metilación bajo (CIMP-L o CIMP-0) y ninguno de ellos presentaba metilación del promotor de *MLH1*. Los otros dos pacientes, presentaban un patrón heterogéneo tanto de IMS como de CIMP. El tumor que presentaba IMS, presentaba un patrón de metilación CIMP-0/L, mientras que el tumor EMS presentaba CIMP-H. En ambos pacientes el patrón de metilación de *MLH1* fue heterogéneo (Tabla 32).

		IMS/EMS	CIMP
Paciente 1	Tumor 1	IMS	CIMP-0/L
	Tumor 2	IMS	CIMP-0/L
Paciente 2	Tumor 1	IMS	CIMP-0/L
	Tumor 2	EMS	CIMP-H
Paciente 3	Tumor 1	IMS	CIMP-0/L
	Tumor 2	EMS	CIMP-H

Tabla 32. Descripción de las características moleculares de los tumores de los pacientes con IMS.

Cabe resaltar que el 42,9% de los pacientes con tumores con IMS presentaban PD-CD, mostrando una prevalencia estadísticamente significativa ($p=0.002$) (Tabla 33).

	PD-CD (n=7)	PD-CI (n=21)	PD-D (n=22)	p valor
IMS	3 (42,9%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	$p=0.002$
EMS	4 (57,1%)	21 (100%)	22 (100%)	

Tabla 33. Porcentaje de pacientes con IMS en función del patrón de distribución.

Los pacientes con EMS, presentaron mayor proporción de pólipos asociados (93,6%) que los pacientes con IMS en alguno de los tumores (33,3%) ($p=0,023$). Ninguno de los pacientes que presentó IMS presentó pólipos hiperplásicos; sin embargo, el 36,2% de los pacientes con EMS en los dos tumores sí lo hizo ($p=0,023$) (Tabla 34).

	IMS (n=3)	EMS(n=47)	p valor
Pólipos asociados	1 (33,3%)	44 (93,6%)	0,023
Pólipos hiperplásicos	0 (0%)	17 (33,6%)	0,023

Tabla 34. Desarrollo de pólipos asociados en función de IMS/EMS de los tumores.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la presencia de adenopatías o metástasis, el grado de diferenciación o el estadio de los tumores en relación a la presencia de tumores con IMS. Ninguno de los pacientes que presentaban al diagnóstico IMS presentó en el seguimiento tumores metacrónicos.

Se agruparon las características tanto de IMS/EMS como el fenotipo metilador CIMP de cada tumor, definiendo cuatro categorías posibles de tumores: IMS-CIMP-H, IMS-CIMP-0/L, EMS-CIMP-H, EMS-CIMP-0/L. Posteriormente se estudió la asociación del patrón molecular de los dos tumores de cada individuo observándose que existía una concordancia moderada ($\kappa=0,47$) (Tabla 35).

Clasificación molecular TUMOR 1	Clasificación molecular TUMOR 2		
	EMS-CIMPO/L	EMS-CIMPH	IMS-CIMPO/L
EMS-CIMPO/L	16 (32,7%)	13 (26,5%)	0 (0,0%)
EMS-CIMPH	0 (0,0%)	17 (34,7%)	0 (0,0%)
IMS-CIMPO/L	0 (0,0%)	2 (4,1%)	1 (2,0%)

Tabla 35 Concordancia del fenotipo de inestabilidad microsatélites y del fenotipo metilador de cada pareja de tumores sincrónicos ($\kappa=0,47$).

4.2.3. Inestabilidad cromosómica

En este estudio se han identificado 98 tumores con EMS correspondientes a 49 pacientes. De éstos en el 47,8% se ha descartado la vía metiladora como responsable del CCR; lo que indica que es la vía de INC es la preponderante.

En 16 pacientes los 2 tumores estudiados presentaban INC. Estos tumores presentaban el siguiente patrón de distribución: 12,5% PD-CD, 31,3% PD-CI y 56,5% PD-C. Estas diferencias no alcanzaron la significación estadística ($p>0,05$).

4.3. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

4.3.1. Análisis del patrón IHQ y las variables anatomo-clínicas

Se ha analizado el patrón IHQ de los tumores de cada individuo. Para ello se han utilizado los marcadores descritos previamente en la sección Material y Métodos; sin embargo, no ha sido posible realizar un estudio IHQ de todos los marcadores en todos los casos, bien por no disponer de pieza tumoral o bien por no haber sido valorable el resultado de la IHQ.

Patrón de expresión de citoqueratina 20, E-cadherina, Smad4 y Ki-67

No se observó asociación, estadísticamente significativa, entre el patrón de expresión de CK20, E-cadherina, Smad4 y Ki-67 y las variables anatomo-clínicas estudiadas.

Patrón de expresión de β -catenina

Patrón de membrana

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el patrón de expresión de membrana de β -catenina en función del estadio del tumor, siendo más frecuente el patrón discordante (+/-) en los pacientes con estadio B de Astler-Coller ($p=0,032$) y T3N0M0 ($p=0,031$) del sistema TNM (Tabla 36).

Patrón nuclear

En el estudio de expresión nuclear de β -catenina, se observó que el patrón de expresión discordante (-/+) se asociaba a un mayor desarrollo de metástasis ($p=0,041$). Del mismo modo, se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el patrón de expresión nuclear y la estadificación de los tumores según la clasificación de Astler-Coller ($p=0,025$) y AJCC ($p=0,093$) (Tabla 36).

Patrón de expresión de p16

La expresión de p16 citoplasmático, en al menos uno de los tumores, se relacionó aunque de manera no estadísticamente significativa, con la persistencia de la enfermedad ($p=0,098$). En el mismo sentido, la expresión de p16 citoplasmático se asoció con una mayor aparición de metástasis ($p=0,094$) y diagnóstico de CCR en estadios más avanzados ($p=0,024$).

Patrón de expresión de p27

La expresión nuclear de p27 en los tumores de bajo grado de diferenciación fue significativamente menor que en los tumores de alto grado ($p=0,039$).

PROTEÍNA	PATRÓN DE IHQ	VARIABLES ANATOMO-CLINICAS ASOCIADAS
β -catenina	De membrana (-/+)	Estadio B de Astler-Coller (p=0,032) Estadio T3N0M0 del sistema TNM (p=0,031)
	Nuclear (-/+)	Mayor desarrollo de metástasis (p=0,041) Mayor estadio en la clasificación de Astler-Coller (p=0,025) y AJCC (p=0,093)
p16	Citoplasmático (-/+) (+/+)	Mayor persistencia de la enfermedad (p=0,098) Mayor desarrollo de metástasis (p=0,094) Diagnóstico de CCR en estadios más avanzados (p=0,024)
p27	Nuclear (-/+) (+/+)	Alto Grado de diferenciación tumoral (p=0,039)

Tabla 36. Resumen de las variables anatómo-clínicas en función del patrón IHQ.

4.3.2. Comparación de la expresión de los diferentes marcadores IHQ entre los tumores del mismo individuo

Se analizó la concordancia de los patrones de expresión de los marcadores estudiados por IHQ en los dos tumores de cada paciente.

Patrón de expresión de citoqueratina 20

El 79% de los pacientes presentaban una expresión concordante de CK20 en los dos tumores estudiados que corresponde a una concordancia según el índice Kappa ($\kappa=0,34$) (Tabla 37).

(κ=0,34)		Expresión de CK20 Tumor 2	
		-	+
Expresión de CK20 Tumor 1	-	3 (8,8%)	5 (14,7%)
	+	2 (5,9%)	24 (70,6%)

Tabla 37. Concordancia de la expresión de CK20 en los tumores sincrónicos.

Patrón de expresión de β -Catenina

Patrón de membrana

La gran mayoría de los tumores sincrónicos (89,5%) tenían expresión de β -catenina moderada o intensa. Sólo cuatro pacientes (10,5%) mostraban discrepancias en la expresión β -catenina sin embargo, ningún paciente mostraba ausencia de expresión o expresión muy débil en los dos tumores estudiados ($\kappa < 0,20$) (Tabla 38).

$\kappa < 0,20$		Expresión de membrana β -catenina Tumor 2	
		-	+
Expresión de membrana β -catenina Tumor 1	-	0 (0%)	3 (7,9%)
	+	1 (2,6%)	34 (89,5%)

Tabla 38. Expresión de membrana de β -catenina en tumores sincrónicos.

Patrón de nuclear

En cuanto a la expresión de β -catenina a nivel nuclear, fue concordante en los dos tumores en el 76% de los pacientes ($\kappa=0,51$) (Tabla 39).

$(\kappa=0,51)$		Expresión nuclear β -Catenina Tumor 2	
		-	+
Expresión nuclear β -Catenina Tumor 2	-	17 (45,9%)	6 (16,2%)
	+	3 (8,1%)	11 (29,7%)

Tabla 39. Expresión nuclear de β -catenina en sincrónicos.

Participación de la vía de señalización wnt

Al analizar los tumores en los que la vía Wnt estaba activada, bien por la ausencia de expresión de β -catenina a nivel de membrana, bien por la presencia de β -catenina a nivel nuclear; se observó una gran concordancia entre los dos tumores del mismo individuo. El 73% de los pacientes presentaban la activación de la vía Wnt en ambos tumores (+/+), mientras que sólo el 27% eran discordantes (-/+ ($\kappa=0,46$) (Tabla 40).

(κ=0,46)		Participación de la vía wnt Tumor 2	
		-	+
Participación de la vía wnt Tumor 1	-	15 (40,5%)	6 (16,2%)
	+	4 (10,8%)	12 (32,4%)

Tabla 40. Activación de la vía Wnt en tumores sincrónicos.

Patrón de expresión de p27, p53, p21 Smad4, E-cadherina y Ki-67

No se encontró ninguna asociación estadísticamente significativa entre el patrón de expresión de p27, p21, p53 y Smad4 entre los tumores del mismo paciente (Tabla 41).

Patrón de expresión		(-/-) (n/total)	(-/+) (n/total)	(+/+) (n/total)	Índice κ
E-cadherina		2/35	23/35	25/35	$\kappa<0,2$
Smad4		11/38	13/38	14/38	$\kappa=0,26$
p27	Nuclear	2/38	30/38	6/38	$\kappa=0,30$
	Citoplasmático	9/35	8/35	18/35	$\kappa<0,2$
p53		29/38	4/38	5/38	$\kappa<0,2$
p21		30/40	0/40	10/40	$\kappa<0,2$
p16	Nuclear	7/37	12/37	8/37	$\kappa<0,2$
	Citoplasmático	30/35	0/35	5/35	$\kappa<0,2$

Tabla 41. Concordancia del patrón de expresión del panel de marcadores de IHQ

No hubo correlación entre el porcentaje de expresión de Ki-67 en los dos tumores sincrónicos de un mismo individuo ($r=0,24$).

4.3.3. Estudio de la expresión de diferentes marcadores en función del patrón de distribución de los tumores.

Se analizó la expresión de los marcadores estudiados por IHQ en función del patrón de distribución de los tumores. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el patrón de expresión y de localización salvo en el caso de la expresión nuclear de la proteína p27. En aquellos pacientes que presentaban tumores con PD-CD fue más frecuente el patrón de expresión nuclear de p27 (+/+) ($p=0,049$) (Tabla 42).

Patrón de expresión nuclear de p27	PD-CD (n=7)	PD-CI (n=17)	PD-D (n=14)
(-/-)	2 (28,6%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)
(-/+)	0 (0,0%)	2 (11,8%)	4 (28,6%)
(+/+)	5 (71,4%)	15 (88,2%)	10 (71,4%)

Tabla 42: Patrón de expresión de p27 nuclear en función del patrón de distribución de los tumores ($p=0,049$).

De forma paralela, se estudió la relación entre la concordancia del fenotipo (-/- o +/+) y el patrón de distribución de los tumores no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos (Tabla 43).

Patrón de expresión (-/-) o (+/+)		PD-CD n/total (%)	PD-CI n/total (%)	PD-D n/total (%)	p valor
CK20		4/7 (57,1%)	13/16 (81,3%)	10/12 (83,3%)	n.s.
E-cadherina		5/6 (83,3%)	8/15 (53,3%)	12/14 (85,7%)	n.s.
B-catenina	Nuclear	4/5 (80%)	12/17 (7,6%)	12/15 (80%)	n.s.
	Membrana	6/6 (10%)	16/17 (94,1%)	12/15 (80%)	n.s.
Activación de la vía Wnt		4/5 (80%)	11/17 (64%)	12/15 (80%)	n.s.
Smad4		6/7 (85,7%)	9/17 (52,9%)	9/14 (64,3%)	n.s.
p27	Nuclear	7/7 (100%)	15/17 (88,2%)	10/14 (71,4%)	n.s.
	Citoplasmático	5/6 (83,3%)	6/16 (37,5%)	6/13 (46,2%)	n.s.
p53		5/7 (71,4%)	10/17 (58,8%)	9/14 (64,3%)	n.s.
p21		6/7 (85,7%)	11/17 (64,7%)	13/16 (81,3%)	n.s.
p16	Nuclear	1/5 (20%)	10/17 (58,8%)	8/15 (53,3%)	n.s.
	Citoplasmático	2/4 (50%)	15/17 (88,2%)	13/14 (92,9%)	n.s.

Tabla 43. Patrón de expresión concordante en IHQ, de los tumores en función del patrón de distribución

Se valoró, de forma global, si la ausencia de expresión de cada marcador (-/- o -/+), en al menos uno de los tumores, estaba relacionada con el patrón de distribución; no encontrándose diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, cabe señalar que en el caso de la expresión nuclear de β -catenina si se observaron diferencias estadísticamente significativas entre PD-CD y CD-CI ($p=0,039$) (Tabla 44).

β -catenina nuclear	PD-CD	PD-CI	p valor
(-/-) o (-/+)	5/5 (100%)	9/17 (52,9%)	0,039
(+/+)	0/5 (0%)	8/17 (47,1%)	

Tabla 44. Fenotipo de ausencia de expresión de β -catenina en al menos uno de los tumores sincrónicos en función del patrón de localización.

Cuando se analizó la activación de la vía de señalización Wnt, en al menos uno de los tumores sincrónicos, se encontró una asociación estadísticamente significativa con el PD-CI ($p=0,021$) (Tabla 45).

Activacion de la vía Wnt	PD-CD	PD-CI	p valor
(+/+) o (-/+)	1/5 (20%)	14/17 (82,4%)	0,021
(-/-)	4/5 (80%)	3/17 (17,6%)	

Tabla 45. Activación de la vía Wnt en al menos uno de los tumores sincrónicos en función del patrón de localización.

5. DISCUSIÓN

El colon presenta una gran extensión de mucosa, con un alto índice de recambio celular lo que le hace especialmente susceptible al desarrollo de neoplasias. El proceso de carcinogénesis se inicia por la aparición de alteraciones genéticas, tanto de carácter hereditario como relacionadas con la exposición ambiental(79). Estas alteraciones pueden promover la aparición de diferentes focos de adenocarcinoma a lo largo de la superficie del colon durante la vida de la persona (76).

Se consideran tumores múltiples primarios de colon a aquellos tumores que aparecen de forma independiente en la misma persona (126) . Cuando el diagnóstico de estas neoplasias se realiza de forma simultánea o en un corto espacio de tiempo se denominan CCR sincrónicos. Si el tiempo transcurrido entre el diagnóstico dos neoplasias es superior a seis meses, se denominan tumores metacrónicos (126).

Se estima que entre el 5-10% de los tumores de colon son múltiples (126). Estudios recientes realizados en series de pacientes con CCR, describen que el 3,4% presentan tumores metacrónicos a los 10 años (132). La prevalencia de CCR sincrónico se sitúa, en las series más largas, entre el 3,1% (85) y el 3,9% (131).

La frecuencia de tumores múltiples es mucho más alta en los síndromes de CCR familiar. Mulder et al evidenciaron una frecuencia del 11,8% de tumores múltiples en el grupo de SL, frente al 3,6% de los casos esporádicos. Hasta el 14% de los pacientes con CCR sincrónico presentaban SL y el 27,6% tenían familiares de primer grado con CCR (131).

Con las experiencias expuestas, parece evidente que la posibilidad de obtener un tamaño muestral amplio es difícil. Es por ello por lo que existen escasos estudios en los que se analizan las características específicas de los CCR sincrónicos cuando se excluyen los síndromes heredo-familiares. Esta dificultad es común en la mayor parte de las publicaciones estudiadas incluida la nuestra (211)(76)(137).

A pesar de las limitaciones, en los últimos tiempos, se están identificando características epidemiológicas, clínicas, anatomo-patológicas, inmunohistoquímicas y genotípicas relevantes del CCR sincrónico no hereditario. El conocimiento de los

factores que favorecen el desarrollo de CCR múltiple, puede permitir el desarrollo de estrategias preventivas (150) (156).

En este estudio se han evaluado 50 pacientes diagnosticados de CCR sincrónico, en los que se descartó poliposis familiar y el SL. En total se detectaron un total de 125 tumores; el 30% de los pacientes presentaba más de 2 tumores en el momento del diagnóstico, una cifra ligeramente superior a lo descrito por otros autores (100).

En algunos estudios publicados se ha observado, que en pacientes con CCR sincrónico, la mediana de edad al diagnóstico, fue mayor que en los pacientes con tumores individuales (156) (76). Sin embargo, esta característica no se ha comprobado en otras publicaciones (96)(100). Por otro lado, en el estudio firmado por Latournerie se describe un mayor riesgo de padecer CCR sincrónico en pacientes de más de 75 años (100). En nuestro estudio la edad media al diagnóstico fue 71,24 años, en sintonía con los resultados previamente descritos. Tal y como expone Samadder, esta patología aparece a una edad media más avanzada que la de los tumores metacrónicos (165).

En la mayoría de las publicaciones se describe un predominio de tumores sincrónicos en varones (156) (16) (100). En nuestra población se ha observado, al igual que en los estudios referidos, una mayor proporción de hombres que de mujeres.

La localización más frecuente de los 125 tumores de nuestra serie, considerando todos los tumores de forma individual, fue en recto, seguido del C.D y C.I. Estos datos fueron muy similares a los encontrados en otros estudios (156).

Anatómicamente, los tumores de CCR sincrónico, suelen aparecer en el mismo área colónica o en segmentos próximos (100). De forma similar a lo realizado en otras publicaciones (156)(206)(24), para tener una localización más homogénea de los tumores, se estableció un patrón de distribución en función de la anatomía del colon, tomando como referencia el ángulo esplénico. Se establecieron tres patrones de distribución, en relación a la situación distal o proximal al ángulo esplénico o en ambos segmentos: PD-CD, PD-CI, PD-D.

En nuestro estudio, el patrón de distribución minoritario fue PD-CD seguido de PD-CI y PD-D. Estos datos son muy diferentes a lo descrito por Hu en un estudio realizado en el año 2013, donde muestra como patrón de distribución mayoritario PD-CD (76). Sin embargo, en la cohorte española publicada por Piñol en el 2004, llama la atención que el patrón de distribución minoritario de los tumores fue PD-CD, igual que ocurre en el estudio que se explica en esta Memoria (156). Piñol asocia esta discrepancia a la falta de registros de cáncer heredo-familiar sistematizados. Sin embargo, otra hipótesis factible sería la influencia de factores geográficos, ambientales y/o sociales en la localización de los tumores.

Los tumores relacionados con el S.L, tienen una localización preferente por el CD (165). En el trabajo publicado por Samadder se muestra además que los CCR sincrónicos tienen una distribución diferente a los tumores solitarios. Estos últimos tienen una distribución preferencial CI (165). La exclusión de CCR heredo-familiar en nuestra estudio, puede explicar la baja proporción de tumores con PD-CD, distribución mayoritaria de los tumores solitarios. No obstante existen controversias en este aspecto, ya que Hu, en su análisis sobre CCR sincrónico realizado en el año 2013, observa una prevalencia de hasta el 50%, de tumores relacionados con el SL en CI (76).

Es sobradamente conocido que las lesiones precursoras del CCR son los pólipos colónicos. El número, el tamaño y las características histológicas de los de pólipos, son factores de riesgo reconocidos para progresar a CCR(17) referencia. En los últimos años se ha descrito que la presencia de un adenoma avanzado se asocia, con independencia de otras variables, a la presencia de tumores sincrónicos (17). En nuestro estudio se observa un menor número de pólipos a nivel de colon derecho, probablemente en relación con la ya indicada exclusión de CCR hereditarios.

La media de pólipos resecados previamente en nuestros pacientes fue de 5,12. En la mayoría de los pacientes, los pólipos eran exclusivamente adenomatosos aunque existía un número no despreciable de pólipos hiperplásicos. Cada vez se da más importancia a vía carcinogénica de la metilación, como factor determinante en la degeneración de los pólipos serrados (134). Se ha comprobado que la presencia de

pólipos serrados se asocia a una mayor incidencia de lesiones avanzadas y tumores sincrónicos (134)(96)(185) (127). Nosho et publicaron en el 2009, que los tumores sincrónicos presentan habitualmente un patrón molecular propio de la vía serrada (137). Este estudio apoya lo descrito en esta Memoria, ya que el 65,3% de los pacientes presentaban fenotipo CIMP-H en al menos uno de los tumores estudiados. Gonzalo et al describieron, de forma similar, un incremento del patrón de metilación en los CCR múltiples (66,6%) frente a los individuales (17,2%) (59). Por tanto, existen datos consistentes para pensar que el nivel de metilación puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de CCR sincrónico.

La clasificación de los pólipos hiperplásicos, avalada por la Organización Mundial de la Salud, propone la distinción de las diferentes modalidades de pólipos por sus implicaciones clínicas (176); sin embargo su aplicación no se ha generalizado. En este sentido, la descripción anatomo-patológica de los tumores evaluados en este estudio, no especificaba el subtipo de pólipos hiperplásicos.

De forma general, se ha observado que, los pólipos localizados en los segmentos de colon más proximales (C.D)(106) junto con los de mayor tamaño, corresponden a pólipos sésiles serrados mientras que los pólipos hiperplásicos localizados a nivel de recto son, en su gran mayoría, pólipos hiperplásicos propiamente dichos (158). A pesar de las limitaciones del estudio, en nuestra serie, también se observó una mayor frecuencia de pólipos hiperplásicos en los pacientes con tumores PD-CD lo que nos hace asumir que se trataban de pólipos serradas.

Una característica anatomo-patológica descrita con frecuencia en los CCR múltiples es la capacidad de producir mucina. Aunque la mayoría de los autores lo relacionan fundamentalmente con los CCR metacrónicos (96)(146), otros lo asocian también con los CCR sincrónicos (77).

En nuestra población se observó que la presencia de adenocarcinoma mucinoso, era un factor característico de los CCR sincrónicos con PD-CD. Es precisamente en los

tumores con PD-CD donde se dieron todos los casos de IMS, otra circunstancia que se asocia, característicamente, a tumores mucinosos (97). Por otra parte, los pólipos serrados, también se localizan principalmente en los segmentos proximales (C.D) y suelen presentar un patrón mucinoso e infiltraciones linfocitarias características (77).

En la mayoría de los estudios publicados se analizan las características anatómicas, considerando el tumor que define el estadio (146). Sin embargo, cuando se trata de analizar las características moleculares, este criterio supone una pérdida de información muy relevante, ya que el estudio de lesiones sincrónicas de un mismo órgano, permite conocer la secuencia de eventos moleculares que se suceden en el proceso de la carcinogénesis. Es por ello por lo que, en nuestro trabajo, se ha realizado el estudio molecular en dos tumores de cada individuo. La selección de parejas permite correlacionar las vías de carcinogénesis afectadas en los diferentes tumores. En el 69,4% de los pacientes, ambos tumores presentaban un nivel de metilación y de IMS/EMS similar, alcanzando un grado de concordancia moderado según el índice de Kappa. Nosho en su estudio del 2009 valorando el nivel de metilación CIMP, observó concordancia entre los distintos tumores sincrónicos (137, 206).

Norrie et al. publicaron en el 2002, una serie de 14 pacientes con CCR sincrónico esporádico. El 35,7% de los pacientes estudiados en este trabajo presentaron IMS en al menos uno de los tumores. Tan sólo un paciente presentaba IMS en dos de los tumores (136). En otros trabajos, en los que no se distingue entre tumores múltiples, en el contexto familiar, y esporádicos muestran prevalencias de IMS del 32% (41, 151). Lawes describe que la frecuencia de inestabilidad puede ser incluso mayor, puesto que en su serie, hasta el 63% de los tumores analizados individualmente presentaban IMS, describiendo un patrón heterogéneo de IMS en el 40,6% de los pacientes (102). Otros autores encuentran niveles de concordancia muy altos entre las dos lesiones (entre el 87% y el 98%) concluyendo que la gran mayoría de los CCR sincrónicos siguen esta vía de carcinogénesis (41) (76). Sin embargo, en el trabajo expuesto en esta Memoria, sólo tres pacientes (6,0%) presentaban IMS; resultados similares a los encontrados en otro estudio, con menor número de pacientes, que valoraba la inestabilidad de

microsatélites únicamente en portadores de CCR esporádico (23). Cabe destacar que el patrón de distribución de todos los tumores con IMS del presente estudio fue PD-CD, a pesar del reducido número de pacientes con esta localización.

En el CCR esporádico la IMS se relaciona, fundamentalmente, con la metilación del promotor del gen *MLH1*. Esta vía es la responsable de aproximadamente el 15% de todos los CCR esporádicos (30) y del 31% en los CCR sincrónicos (137). En el estudio realizado por Norrie, uno de los escasos estudios sobre CCR sincrónico no hereditario, también se observó mayor frecuencia de metilación de *MLH1*. Sin embargo, la concordancia de metilación de *MLH1* entre los tumores, fue relativamente baja. Dadas las discrepancias entre los tumores, el autor concluyó que los tumores sincrónicos son sucesos independientes y que la tendencia a presentar mayor IMS, se debe bien a la casualidad o bien a la edad avanzada de la población estudiada (136). En la serie descrita en esta Memoria, tres pacientes presentaban IMS en los tumores analizados y sólo uno de ellos tenía un patrón IMS/IMS. Los otros dos pacientes, presentaban un patrón de metilación heterogéneo (IMS/EMS) y metilación del promotor de *MLH1*, igual que describió Norrie en su trabajo. Llama la atención que sólo dos pacientes presentasen IMS asociada a la metilación del gen *MLH1*, a pesar del elevado número de pacientes en los que el gen *MLH1* estaba metilado. Esto puede ser debido a que sólo la completa inactivación del gen, por metilación de la región promotora, provoca la ausencia de expresión de la proteína(88).

La IMS relacionada con la metilación de *MLH1* está íntimamente relacionada con la aparición de mutaciones de *BRAF*. *BRAF* es un oncogén, necesario para el desarrollo de tumores a través de la vía metiladora, cuya mutación estimula la proliferación y supervivencia celular, inhibiendo la apoptosis(105). La mutación de este gen se observan en tumores con IMS y pólipos serrados. La carencia de datos relacionados con la presencia o ausencia de *BRAF*, limita en cierta forma nuestro estudio. No obstante la mutación *BRAF* se correlaciona con el fenotipo metilador de forma directa cuando se presenta IMS (196).

En el análisis de los factores que podrían influir en el grado de metilación de los tumores, observamos que en los varones, comparados con las mujeres, el grado de metilación parece mayor, ya que con más frecuencia presentaban CIMP-H en al menos uno de los tumores. Estos hallazgos son concordantes con los publicados en el 2014 por Gonzalo et al (59).

Algunos autores han encontrado un patrón de metilación característico considerando ciertos genes de forma individual (59). En este trabajo se ha valorado la metilación del panel de genes descrito previamente por Nosho y Yamauchi. Tras un análisis exhaustivo se ha podido relacionar el patrón de metilación de algunos de los genes con ciertas variables con significado pronóstico (137) (206).

El gen *CACNA1G* codifica para un canal de calcio que se activa en respuesta a las modificaciones del voltaje de la membrana celular. Está relacionado con la vía de las MAP quinasas (MAPK) y puede modificar la proliferación celular y la respuesta a la apoptosis (184). La concordancia, a nivel de metilación, de *CACNA1G* (+/+) parece relacionarse con un mayor desarrollo de metástasis, una mayor afectación linfática, mayor persistencia de la enfermedad y muerte relacionada con CCR. Del mismo modo, un el patrón de metilación (+/+) para los genes *NEUROG1* y *SOC1* se relacionó con la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico. Por tanto, probablemente, el condicionante pronóstico no dependa del nivel de metilación de forma global, sino del grado de metilación específica de determinados genes. Como se ha comprobado en nuestro estudio, dentro del panel de metilación hay genes asociados de manera estadísticamente significativa con peor pronóstico sin embargo otros no presentan tal asociación. Lee, en una reciente publicación, describe la relación entre la metilación de los genes *NEUROG1* y *CDKN2A* con una menor supervivencia global y menor tiempo libre de enfermedad, sin que se acompañase de asociación significativa con el patrón de metilación global CIMP (104).

No obstante, es difícil concluir que la metilación en estos genes, tenga un papel etiopatogénico directo hacia una peor evolución; hay que tener en cuenta que estos hallazgos pueden tratarse de epifenómenos (143). En este sentido hay que tener en

cuenta que la inestabilidad de microsatélites (IMS) es un conocido factor de buen pronóstico. Probablemente el pronóstico de los CCR sincrónicos puede variar mucho en función de si el nivel de metilación alto se asocia o no a IMS (106).

Varios autores han descrito la existencia de diferentes patrones genéticos y epigenéticos en función de la localización de los tumores a lo largo del colon. (124)(191)(2)(175). Se ha observado un incremento progresivo en la frecuencia de CIMP-H/IMS desde el recto, donde es inferior al 2,3%, hasta el colon ascendente (36-40%), con un descenso de nuevo a nivel de ciego (206). En el mismo estudio, se observa que la proporción de tumores con fenotipo (CIMP-H/EMS) también sufre un ligero incremento en sentido proximal, pero proporcionalmente mucho menor que los inestables.

Existen pocos estudios que analicen el patrón de metilación de los CCR sincrónicos respecto a la distribución de los tumores. Por ello, éste es un aspecto fundamental en nuestro estudio. Los datos revelan una mayor frecuencia de tumores CIMP-H en el PD-CI; sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Zauber et al, observaron que el patrón genético era muy similar entre los tumores que se localizan en el mismo segmento, mientras que cuando los tumores se encontraban en segmentos distantes, la concordancia en el patrón molecular disminuía a menos de la mitad (211). Esto coincide con los resultados publicados por Nosho et al. donde, analizando un panel de genes igual al nuestro, describen mayor concordancia en el patrón de metilación de los tumores que se localizan próximos (137). En el trabajo que se expone en esta Memoria, sin embargo, los resultados fueron contrarios a los descritos por estos autores. Los tumores con PD-D presentaban un grado de concordancia mayor que los tumores con PD segmentario (PD-CD y PD-CI). Estas discrepancias en los resultados pueden ser debidas a que, como ya se ha mencionado anteriormente, la exclusión de los tumores con patrón de CCR hereditario, disminuye la proporción de tumores de localización exclusivamente segmentaria, y en concreto en CD.

Existen otros datos distintivos entre los tumores con PD-D y segmentario. El patrón de metilación (-/-) de *CDKN2A* e *IGF2* fue excepcional en los pacientes con PD segmentario. Podría resultar muy interesante realizar estudios más exhaustivos para valorar si los patrones de metilación *CDKN2A* e *IGF2*, en mucosa sana o adenomas, podrían ser marcadores predictivos del desarrollo de tumores múltiples. Hay autores que proponen realizar resecciones quirúrgicas más amplias a los pacientes con factores de riesgo para el desarrollo de tumores metacrónicos (165).

En algunas publicaciones ya se había relacionado la metilación con el riesgo de CCR metacrónico. Kamiyama et al, comprobaron que el nivel de metilación de LINE-1 se correlacionaba con el riesgo de presentar un tumor metacrónico en el seguimiento. En nuestro estudio no hemos estudiado la metilación de LINE-1. Los análisis se han centrado en la metilación tipo C, basada en el estudio de las islas CpG, obteniendo como resultado el fenotipo CIMP. Esta última vía es la más relacionada con el desarrollo de neoplasias (202).

El estudio IHQ de los tumores permite caracterizar las distintas estirpes celulares además de identificar aspectos morfológicos y pronóstico. Se realizó una tipificación de varios factores, relacionados con diferentes eventos del proceso de carcinogénesis. El objetivo de realizar estos estudios, era identificar diferencias fenotípicas entre los tumores sincrónicos de cada individuo y su relación con factores pronóstico.

Se ha encontrado que la expresión de p27, en al menos uno de los tumores, se asoció con mayor grado de diferenciación tumoral y, por tanto, mejor pronóstico. Por otro lado, la expresión de p16 en al menos uno de los tumores se relacionó con factores peor pronóstico de la enfermedad. Estos datos están apoyados por lo descrito previamente por otros autores(204)(114).

En el trabajo expuesto en esta Memoria, la expresión discordante de β -catenina se asoció a mayor desarrollo de metástasis y estadios tumorales más avanzados.

β -catenina es un efector de la transcripción a través de la activación Wnt. La activación de esta vía se demuestra por la expresión de β -catenina en el núcleo o su ausencia a nivel de membrana (207) (75). El estudio de la expresión de β -catenina a nivel nuclear mostró una concordancia moderada entre los dos tumores sincrónicos de cada paciente. β -catenina tiene un patrón de distribución nuclear en células indiferenciadas. Se ha descrito que la expresión de β -catenina se puede modificar en función del microambiente del tumor, habiéndose observado que en los tumores con alto grado de diferenciación, los clones que se desarrollan en las metástasis recuperan la polaridad propia de las células epitelioideas (19). La disposición celular dentro del tumor, puede modificar el patrón de localización de β -catenina ya que está descrito que es en el frente invasor del tumor donde hay una expresión nuclear mayoritaria (103). Esta variabilidad en la expresión de β -catenina en el propio tumor, podría restar trascendencia a las diferencias entre tumores distantes, ya que las células tumorales pueden estar expuestas a microambientes muy diferentes.

La expresión de β -catenina a nivel nuclear, fue más profusa en los tumores con PD-CI. Sin embargo, ningún paciente con PD-CD presentó expresión de β -catenina en los dos tumores. Es este un claro aspecto diferenciador de las dos localizaciones. En la mayoría de los pacientes, la vía de señalización Wnt, juega un papel relevante por lo menos en uno de los tumores. Esto ocurre fundamentalmente en los tumores con PD-CI concordado con los resultados obtenidos en relación a la expresión nuclear de β -catenina.

Como resumen de este trabajo, se puede decir que los tumores de cada individuo no son concordantes en todos los aspectos, a pesar de estar localizados en el mismo órgano y en el mismo momento. Esto puede ser debido a que en el proceso de carcinogénesis, pueden suceder eventos etiopatogénicos comunes, que provoquen alteraciones moleculares similares, pero existen otras modificaciones, que se producen de manera independiente y que diferencian a un tumor de otro. En general, se considera que los eventos comunes se producen al inicio del proceso y los rasgos diferenciales sobrevienen en la progresión del tumor (187)(125)(66).

6. CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos se extrajeron las siguientes conclusiones:

1. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, presenta diferencias anatómicas específicas en función de su patrón de distribución; siendo características de los tumores localizados en colon derecho, una menor frecuencia de pólipos asociados y una mayor producción de mucina.
2. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario se presenta, mayoritariamente, con patrón de distribución difuso o con patrón de distribución en colon izquierdo.
3. En el cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, el patrón de distribución en colon derecho presenta características moleculares específicas: una menor concordancia del fenotipo CIMP y una mayor frecuencia de tumores con inestabilidad de microsatélites.
4. Atendiendo a la clasificación molecular global, por criterios de CIMP y de IMS, los tumores sincrónicos no hereditarios presentan un nivel de concordancia moderado.
5. El cáncer colorrectal sincrónico no hereditario, presenta fenotipo metilador alto con elevada frecuencia, siendo excepcional la inestabilidad de microsatélites como vía de carcinogénesis.
6. El patrón de metilación de los genes CKDN2A, IGF2 y SOCS1 en los tumores sincrónicos muestra diferencias en función de que la distribución sea segmentaria o difusa.
7. Diferencias en el patrón de expresión de las proteínas p16, p27 y β -catenina se asocian a variables con significado pronóstico.
8. La expresión a nivel nuclear, de β -catenina y, por tanto, de la activación de la vía de señalización Wnt, presenta una concordancia moderada entre los tumores de cada individuo, siendo más frecuente su participación en el proceso de carcinogénesis de los tumores con patrón de distribución en colon izquierdo.

7. BIBLIOGRAFÍA

A

1. Al-Sohaily S, Biankin A, Leong R, Kohonen-Corish M, Warusavitarne J. 2012. Molecular pathways in colorectal cancer. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 27(9):1423–31
2. Ang PW, Loh M, Liem N, Lim PL, Grieu F, et al. 2010. Comprehensive profiling of dna methylation in colorectal cancer reveals subgroups with distinct clinicopathological and molecular features. *BMC Cancer.* 10:227
3. Armaghany T, Wilson JD, Chu Q, Mills G. 2012. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest. Cancer Res.* 5(1):19–27
4. Asano T, McLeod RS. 2002. Dietary fibre for the prevention of colorectal adenomas and carcinomas. *Cochrane database Syst. Rev.*, p. CD003430
5. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. 1992. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas. *N. Engl. J. Med.* 326(10):658–62
6. Aune D, Chan DSM, Lau R, Vieira R, Greenwood DC, et al. 2011. Dietary fibre, whole grains, and risk of colorectal cancer: systematic review and dose-response meta-analysis of prospective studies. *BMJ.* 343:d6617

B

7. Baca B, Beart RW, Etzioni DA. 2011. Surveillance after colorectal cancer resection: a systematic review. *Dis. Colon Rectum.* 54(8):1036–48
8. Balmaña J, Castells A, Cervantes A. 2010. Familial colorectal cancer risk: esmo clinical practice guidelines. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 5(Supplement 5):v78–81

9. Banerjea A, Hands RE, Powar MP, Bustin SA, Dorudi S. 2009. Microsatellite and chromosomal stable colorectal cancers demonstrate poor immunogenicity and early disease recurrence. *Color. Dis.* 11(6):601–8
10. Bartlett DL, Chu E. 2012. Can metastatic colorectal cancer be cured? *Oncology (Williston Park)*. 26(3):266–75
11. Bellizzi AM. 2013. Contributions of molecular analysis to the diagnosis and treatment of gastrointestinal neoplasms. *Semin. Diagn. Pathol.* 30(4):329–61
12. Berends MJW, Hollema H, Wu Y, Van Sluis T Der, Mensink RGJ, et al. 2001. Mlh1 and msh2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer. *Int. J. Cancer.* 92(March):398–403
13. Boland CR, Goel A. 2010. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 138(6):
14. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, et al. 1998. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 58(22):5248–57
15. Boparai KS, Mathus-Vliegen E, Koornstra JJ, Nagengast F, Van Leerdam ME, et al. 2009. Increased colorectal cancer risk during follow-up in patients with hyperplastic polyposis syndrome: a multicenter cohort study. *Gastroenterology.* 136(5):A449
16. Borda a, Martínez-Peñuela JM, Muñoz-Navas M, Prieto C, Betés M, Borda F. 2008. Synchronous neoplastic lesions in colorectal cancer. an analysis of possible risk factors favouring presentation. *Rev. Esp. Enferm. Dig.* 100(3):139–45

17. Borda A, Martínez-Peñuela JM, Borda F, Muñoz-Navas M, Jiménez FJ, Carretero C. 2012. Drawing up an individual risk index for development of metachronous neoplastic lesions in resected colorectal cancer. *Rev. Española Enfermedades Dig.* 104(6):291–97
18. Bourne HR, Sanders DA, McCormick F. 1991. The gtpase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature.* 349(6305):117–27
19. Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, et al. 2001. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98(18):10356–61
20. Briggs S, Tomlinson I. 2013. Germline and somatic polymerase ϵ and δ mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J. Pathol.* 230(2):148–53
21. Broomé U, Bergquist A. 2006. Primary sclerosing cholangitis, inflammatory bowel disease, and colon cancer. *Semin. Liver Dis.* 26(1):31–41
22. Brown EM, Sadarangani M, Finlay BB. 2013. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nat. Immunol.* 14(7):660–67
23. Brueckl WM, Limmert T, Brabletz T, Guenther K, Jung A, et al. Mismatch repair deficiency in sporadic synchronous colorectal cancer. *Anticancer Res.* 20(6C):4727–32
24. Buda A, De Bona M, Dotti I, Piselli P, Zabeo E, et al. 2012. Prevalence of different subtypes of serrated polyps and risk of synchronous advanced colorectal neoplasia in average-risk population undergoing first-time colonoscopy
25. Burt RW. 2000. Colon cancer screening. *Gastroenterology.* 119(3):837–53

26. Butterly LF, Chase MP, Pohl H, Fiarman GS. 2006. Prevalence of clinically important histology in small adenomas. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 4(3):343–48
27. Byers SW, Rowlands T, Beildeck M, Bong Y-S. 2012. Mechanism of action of vitamin d and the vitamin d receptor in colorectal cancer prevention and treatment. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 13(1):31–38

C

28. Cai G, Xu Y, Lu H, Shi Y, Lian P, et al. 2008. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite- and chromosomal-stable colorectal cancers. *Int. J. Colorectal Dis.* 23(4):365–73
29. Caldas C, Pharoah PDP. 2004. Molecular genetics and the assessment of human cancers. *Expert Rev. Mol. Med.* 1(08):1–19
30. Carethers JM. 2014. Differentiating lynch-like from lynch syndrome. *Gastroenterology.* 146(3):602–4
31. Castells A, Marzo-Castillejo M, Mascort JJ, Amador FJ, Andreu M, et al. 2009. [clinical practice guideline. prevention of colorectal cancer. 2009 update. asociación española de gastroenterología]. *Gastroenterol. Hepatol.* 32(10):717.e1–58
32. Chan TL, Curtis LC, Leung SY, Farrington SM, Ho JW, et al. 2001. Early-onset colorectal cancer with stable microsatellite dna and near-diploid chromosomes. *Oncogene.* 20(35):4871–76
33. Chen HS, Sheen-Chen SM. 2000. Synchronous and “early” metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Dis. Colon Rectum.* 43(8):1093–99

34. Chung M, Lee J, Terasawa T, Lau J, Trikalinos TA. 2011. Vitamin d with or without calcium supplementation for prevention of cancer and fractures: an updated meta-analysis for the u.s. preventive services task force. *Ann. Intern. Med.* 155(12):827–38
35. Cunningham D, Atkin W, Lenz H-J, Lynch HT, Minsky B, et al. 2010. Colorectal cancer. *Lancet.* 375(9719):1030–47

D

36. Davis DM, Marcet JE, Frattini JC, Prather AD, Mateka JLL, Nfonsam VN. 2011. Is it time to lower the recommended screening age for colorectal cancer? *J. Am. Coll. Surg.* 213(3):352–61
37. De Haan MC, Pickhardt PJ, Stoker J. 2015. Ct colonography: accuracy, acceptance, safety and position in organised population screening. *Gut.* 64(2):342–50
38. Desch CE. 2005. Colorectal cancer surveillance: 2005 update of an american society of clinical oncology practice guideline. *J. Clin. Oncol.* 23(33):8512–19
39. Dominianni C, Huang W-Y, Berndt S, Hayes RB, Ahn J. 2013. Prospective study of the relationship between coffee and tea with colorectal cancer risk: the plco cancer screening trial. *Br. J. Cancer.* 109(5):1352–59
40. Douma S, Van Laar T, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van Garderen E, Peeper DS. 2004. Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor trkb. *Nature.* 430(7003):1034–39
41. Dykes SL, Qui H, Rothenberger DA, García-Aguilar J. 2003. Evidence of a preferred molecular pathway in patients with synchronous colorectal cancer. *Cancer.* 98(1):48–54

E

42. Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. 2001. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 48(4):526–35
43. Eaden JA, Mayberry JF. 2002. Guidelines for screening and surveillance of asymptomatic colorectal cancer in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 51 Suppl 5:V10–12
44. Edge SB, Compton CC. 2010. The american joint committee on cancer: the 7th edition of the ajcc cancer staging manual and the future of tnm. *Ann. Surg. Oncol.* 17(6):1471–74
45. Enker WE, Dragacevic S. 1978. Multiple carcinomas of the large bowel: a natural experiment in etiology and pathogenesis. *Ann. Surg.* 187(1):8–11

F

46. Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 61(5):759–67
47. Fedirko V, Tramacere I, Bagnardi V, Rota M, Scotti L, et al. 2011. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose-response meta-analysis of published studies. *Ann. Oncol.* 22(February):1958–72
48. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, et al. 2013. *GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase. No. 11 [Internet]*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer.

49. Figueiredo JC, Hsu L, Hutter CM, Lin Y, Campbell PT, et al. 2014. Genome-wide diet-gene interaction analyses for risk of colorectal cancer. *PLoS Genet.* 10(4):e1004228
50. Flood A, Mai V, Pfeiffer R, Kahle L, Remaley AT, et al. 2007. Elevated serum concentrations of insulin and glucose increase risk of recurrent colorectal adenomas. *Gastroenterology.* 133(5):1423–29
51. Fukushima T, Takenoshita S. 2001. Colorectal carcinogenesis. *Fukushima J. Med. Sci.* 47(1):1–11

G

52. Gammon A, Jaspersion K, Kohlmann W, Burt RW. 2009. Hamartomatous polyposis syndromes. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 23(2):219–31
53. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *J. Immunol.* 133(4):1710–15
54. Giardiello FM, Brensinger JD, Luce MC, Petersen GM, Cayouette MC, et al. 1997. Phenotypic expression of disease in families that have mutations in the 5' region of the adenomatous polyposis coli gene. *Ann. Intern. Med.* 126(7):514–19
55. Giovannucci E. 1998. Meta-analysis of coffee consumption and risk of colorectal cancer. *Am. J. Epidemiol.* 147(11):1043–52
56. Giovannucci E, Ascherio A, Rimm EB, Colditz GA, Stampfer MJ, Willett WC. 1995. Physical activity, obesity, and risk for colon cancer and adenoma in men. *Ann. Intern. Med.* 122(5):327–34

57. Glimelius B, Tiret E, Cervantes A, Arnold D. 2013. Rectal cancer: esmo clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 24(suppl 6):vi81–88
58. Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, et al. 2003. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 63(7):1608–14
59. Gonzalo V, Lozano JJ, Alonso-Espinaco V, Moreira L, Muñoz J, et al. 2014. Multiple sporadic colorectal cancers display a unique methylation phenotype. *PLoS One.* 9(3):e91033
60. Grady WM. 2003. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology.* 124(6):1574–94
61. Greenstein a J. 2000. Cancer in inflammatory bowel disease. *Mt. Sinai J. Med.* 67(3):227–40
62. Greenstein AJ, Slater G, Heimann TM, Sachar DB, Aufses AH. 1986. A comparison of multiple synchronous colorectal cancer in ulcerative colitis, familial polyposis coli, and de novo cancer. *Ann. Surg.* 203(2):123–28
63. Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 140(6):883–99
64. Guo W, Giancotti FG. 2004. Integrin signalling during tumour progression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5(10):816–26

H

65. Hagggar FA, Boushey RP. 2009. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin. Colon Rectal Surg.* 22(4):191–97

-
66. Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144(5):646–74
 67. Harnack L, Jacobs DR, Nicodemus K, Lazovich D, Anderson K, Folsom AR. 2002. Relationship of folate, vitamin b-6, vitamin b-12, and methionine intake to incidence of colorectal cancers. *Nutr. Cancer*. 43(2):152–58
 68. Harris GJC, Church JM, Senagore AJ, Lavery IC, Hull TL, et al. 2002. Factors affecting local recurrence of colonic adenocarcinoma. *Dis. Colon Rectum*. 45(8):1029–34
 69. Hart AR, Kudo S, Mackay EH, Mayberry JF, Atkin WS. 1998. Flat adenomas exist in asymptomatic people: important implications for colorectal cancer screening programmes. *Gut*. 43(2):229–31
 70. Hartnett L, Egan LJ. 2012. Inflammation, dna methylation and colitis-associated cancer. *Carcinogenesis*. 33(4):723–31
 71. Hawkins NJ, Tomlinson I, Meagher A, Ward RL. 2001. Microsatellite-stable diploid carcinoma: a biologically distinct and aggressive subset of sporadic colorectal cancer. *Br. J. Cancer*. 84(2):232–36
 72. Hawkins NJ, Ward RL. 2001. Sporadic colorectal cancers with microsatellite instability and their possible origin in hyperplastic polyps and serrated adenomas. *J. Natl. Cancer Inst*. 93(17):1307–13
 73. Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, et al. 2003. Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am. J. Pathol*. 162(2):469–77

74. Herrinton LJ, Liu L, Levin TR, Allison JE, Lewis JD, Velayos F. 2012. Incidence and mortality of colorectal adenocarcinoma in persons with inflammatory bowel disease from 1998 to 2010. *Gastroenterology*. 143(2):382–89
75. Hino S, Tanji C, Nakayama KI, Kikuchi A. 2005. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic amp-dependent protein kinase stabilizes beta-catenin through inhibition of its ubiquitination. *Mol. Cell. Biol.* 25(20):9063–72
76. Hu H, Chang DT, Nikiforova MN, Kuan S-F, Pai RK. 2013. Clinicopathologic features of synchronous colorectal carcinoma: a distinct subset arising from multiple sessile serrated adenomas and associated with high levels of microsatellite instability and favorable prognosis. *Am. J. Surg. Pathol.* 37(11):1660–70
77. Huangkai. 2013. Clinicopathologic features of synchronous colorectal carcinoma. *Am. J. Surg.* 37(11):1660–70

I

78. Issa JP, Ahuja N, Toyota M, Bronner MP, Brentnall TA. 2001. Accelerated age-related cpg island methylation in ulcerative colitis. *Cancer Res.* 61(9):3573–77
79. Itzkowitz SH, Yio X. 2004. Inflammation and cancer iv. colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287(1):G7–17

J

80. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. 2010. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 138(6):2044–58

81. Jass JR, Stewart SM. 1992. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*. 33(6):783–86
82. Jass JR, Walsh MD, Barker M, Simms LA, Young J, Leggett BA. 2002. Distinction between familial and sporadic forms of colorectal cancer showing dna microsatellite instability. *Eur. J. Cancer*. 38(7):858–66
83. Jensen AB, Larsen M, Gislum M, Skriver M V, Jepsen P, et al. 2006. Survival after colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a nationwide population-based danish study. *Am. J. Gastroenterol*. 101(6):1283–87
84. Johnson CM, Wei C, Ensor JE, Smolenski DJ, Amos CI, et al. 2013. Meta-analyses of colorectal cancer risk factors. *Cancer Causes Control*. 24(6):1207–22

K

85. Kaibara N, Koga S, Jinnai D. 1984. Synchronous and metachronous malignancies of the colon and rectum in japan with special reference to a coexisting early cancer. *Cancer*. 54(9):1870–74
86. Kakar S, Deng G, Sahai V, Matsuzaki K, Tanaka H, et al. 2008. Clinicopathologic characteristics, cpg island methylator phenotype, and braf mutations in microsatellite-stable colorectal cancers without chromosomal instability. *Arch. Pathol. Lab. Med*. 132(6):958–64
87. Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CVA, et al. 2004. Braf mutation is associated with dna methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 53(8):1137–44
88. Kanaya T, Kyo S, Maida Y, Yatabe N, Tanaka M, et al. 2003. Frequent hypermethylation of mlh1 promoter in normal endometrium of patients with endometrial cancers. *Oncogene*. 22(15):2352–60

89. Kastrinos F, Steyerberg EW, Balmaña J, Mercado R, Gallinger S, et al. 2013. Comparison of the clinical prediction model premm(1,2,6) and molecular testing for the systematic identification of lynch syndrome in colorectal cancer. *Gut*. 62(2):272–79
90. Kastrinos F, Steyerberg EW, Mercado R, Balmaña J, Holter S, et al. 2011. The premm1,2,6 model predicts risk of mlh1, msh2, and msh6 germline mutations based on cancer history. *Gastroenterology*. 140(1):73–81.e5
91. Katsumata K, Sumi T, Tomioka H, Aoki T, Koyanagi Y. 2003. Induction of apoptosis by p53, bax, bcl-2, and p21 expressed in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Oncol*. 8(6):352–56
92. Kirsch DG, Kastan MB. 1998. Tumor-suppressor p53: implications for tumor development and prognosis. *J. Clin. Oncol*. 16(9):3158–68
93. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, et al. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med*. 4(7):844–47
94. Koushik A, Hunter DJ, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, et al. 2007. Fruits, vegetables, and colon cancer risk in a pooled analysis of 14 cohort studies. *J. Natl. Cancer Inst*. 99(19):1471–83

L

95. Labianca R, Beretta GD, Kildani B, Milesi L, Merlin F, et al. 2010. Colon cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 74(2):106–33
96. Lam AK-YY, Carmichael R, Gertraud Buettner P, Gopalan V, Ho Y-HH, Siu S. 2011. Clinicopathological significance of synchronous carcinoma in colorectal cancer. *Am. J. Surg*. 202(1):39–44

-
97. Lam AK-YY, Chan SS-YY, Leung M. 2014. Synchronous colorectal cancer: clinical, pathological and molecular implications. *World J. Gastroenterol.* 20(22):6815–20
 98. Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, et al. 1999. The type of somatic mutation at apc in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to knudson's "two-hit" hypothesis. *Nat. Med.* 5(9):1071–75
 99. Lane DP. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 358(6381):15–16
 100. Latournerie M, Jooste V, Cottet V, Lepage C, Faivre J, Bouvier A-MM. 2008. Epidemiology and prognosis of synchronous colorectal cancers. *Br. J. Surg.* 95(12):1528–33
 101. Laurent S, Franchimont D, Coppens JP, Leunen K, Macken L, et al. 2011. Familial adenomatous polyposis: clinical presentation, detection and surveillance. *Acta Gastroenterol. Belg.* 74(3):415–20
 102. Lawes DA, Pearson T, Sengupta S, Boulos PB. 2005. The role of mlh1, msh2 and msh6 in the development of multiple colorectal cancers. *Br. J. Cancer.* 93(4):472–77
 103. Le NH, Franken P, Fodde R. 2008. Tumour-stroma interactions in colorectal cancer: converging on beta-catenin activation and cancer stemness. *Br. J. Cancer.* 98(12):1886–93
 104. Lee D-W, Han S-W, Cha Y, Rhee YY, Bae JM, et al. 2015. Different prognostic effect of cpg island methylation according to sex in colorectal cancer patients treated with adjuvant folfox. *Clin. Epigenetics.* 7(1):63
 105. Leggett B, Whitehall V. 2010. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 138(6):2088–2100

106. Leggett B a., Worthley DL. 2009. Synchronous colorectal cancer: not just bad luck? *Gastroenterology*. 137(5):1559–62
107. Leighton JA, Shen B, Baron TH, Adler DG, Davila R, et al. 2006. Asge guideline: endoscopy in the diagnosis and treatment of inflammatory bowel disease. *Gastrointest. Endosc.* 63(4):558–65
108. Lichtenstein P, Holm N V, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, et al. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from sweden, denmark, and finland. *N. Engl. J. Med.* 343(2):78–85
109. Lieberman D, Moravec M, Holub J, Michaels L, Eisen G. 2008. Polyp size and advanced histology in patients undergoing colonoscopy screening: implications for ct colonography. *Gastroenterology*. 135(4):1100–1105
110. Lindor NM. 2009. Hereditary colorectal cancer: myh-associated polyposis and other newly identified disorders. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 23(1):75–87
111. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, et al. 2002. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J. Clin. Oncol.* 20(4):1043–48
112. Loda M, Cukor B, Tam SW, Lavin P, Fiorentino M, et al. 1997. Increased proteasome-dependent degradation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in aggressive colorectal carcinomas. *Nat. Med.* 3(2):231–34
113. López-Abente G, Ardanaz E, Torrella-Ramos A, Mateos A, Delgado-Sanz C, Chirlaque MD. 2010. Changes in colorectal cancer incidence and mortality trends in spain. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 3:iii76–82

114. Lugli A, Zlobec I, Minoo P, Baker K, Tornillo L, et al. 2007. Prognostic significance of the wnt signalling pathway molecules apc, β -catenin and e-cadherin in colorectal cancer? a tissue microarray-based analysis. *Histopathology*. 50(4):453–64

M

115. Ma J, Pollak MN, Giovannucci E, Chan JM, Tao Y, et al. 1999. Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (igf)-i and igf-binding protein-3. *J. Natl. Cancer Inst.* 91(7):620–25
116. MacLennan R, Macrae F, Bain C, Battistutta D, Chapuis P, et al. 1995. Randomized trial of intake of fat, fiber, and beta carotene to prevent colorectal adenomas. *J. Natl. Cancer Inst.* 87(23):1760–66
117. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, et al. 1995. P53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and dna damage. *Genes Dev.* 9(8):935–44
118. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, et al. 1995. Inactivation of the type ii tgf-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 268(5215):1336–38
119. McGarrity TJ, Amos C. 2006. Peutz-jeghers syndrome: clinicopathology and molecular alterations. *Cell. Mol. Life Sci.* 63(18):2135–44
120. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WAG, Goossens M, Ouchene H, et al. 2014. Somatic mutations in mlh1 and msh2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*. 146(3):643–46.e8

121. Meyerhardt JA, Mangu PB, Flynn PJ, Korde L, Loprinzi CL, et al. 2013. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: american society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement. *J. Clin. Oncol.* 31(35):4465–70
122. Michels KB, Willett WC, Fuchs CS, Giovannucci E. 2005. Coffee, tea, and caffeine consumption and incidence of colon and rectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 97(4):282–92
123. Minoo P, Baker K, Goswami R, Chong G, Foulkes WD, et al. 2006. Extensive dna methylation in normal colorectal mucosa in hyperplastic polyposis. *Gut.* 55(10):1467–74
124. Minoo P, Zlobec I, Peterson M, Terracciano L, Lugli A. 2010. Characterization of rectal, proximal and distal colon cancers based on clinicopathological, molecular and protein profiles. *Int. J. Oncol.* 37(3):707–18
125. Miyaki M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, et al. 1994. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res.* 54(11):3011–20
126. MOERTEL CG, BARGEN JA, DOCKERTY MB. 1958. Multiple carcinomas of the large intestine: a review of the literature and a study of 261 cases. *Gastroenterology.* 34(1):85–98
127. Mohammadi M, Kristensen MH, Nielsen HJ, Bonde JH, Holck S. 2012. Qualities of sessile serrated adenoma/polyp/lesion and its borderline variant in the context of synchronous colorectal carcinoma. *J. Clin. Pathol.* 65(10):924–27
128. Moon B-S, Jeong W-J, Park J, Kim T II, Min DS, Choi K-Y. 2014. Role of oncogenic k-ras in cancer stem cell activation by aberrant wnt/ β -catenin signaling. *J. Natl. Cancer Inst.* 106(2):djt373

129. Morán A, Ortega P, de Juan C, Fernández-Marcelo T, Frías C, et al. 2010. Differential colorectal carcinogenesis: molecular basis and clinical relevance. *World J. Gastrointest. Oncol.* 2(3):151–58
130. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, et al. 1997. Activation of beta-catenin-tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or apc. *Science.* 275(5307):1787–90
131. Mulder SA, Kranse R, Damhuis R a, de Wilt JHW, Ouwendijk RJT, et al. 2011. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a dutch population-based study. *Cancer Epidemiol.* 35(5):442–47
132. Mulder SA, Kranse R, Damhuis R a., Ouwendijk RJT, Kuipers EJ, van Leerdam ME. 2012. The incidence and risk factors of metachronous colorectal cancer: an indication for follow-up. *Dis. Colon Rectum.* 55(5):522–31
133. Müller A, Giuffre G, Edmonston TB, Mathiak M, Roggendorf B, et al. 2004. Challenges and pitfalls in hnpcc screening by microsatellite analysis and immunohistochemistry. *J. Mol. Diagn.* 6(4):308–15

N

134. Ng SC, Ching JYL, Chan VCW, Wong MCS, Tang R, et al. 2015. Association between serrated polyps and the risk of synchronous advanced colorectal neoplasia in average-risk individuals. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 41(1):108–15
135. Norat T, Bingham S, Ferrari P, Slimani N, Jenab M, et al. 2005. Meat, fish, and colorectal cancer risk: the european prospective investigation into cancer and nutrition. *J. Natl. Cancer Inst.* 97(12):906–16

136. Norrie MWA, Hawkins NJ, Todd A V, Meagher AP, O'Connor TW, Ward RL. 2002. The role of hmlh1 methylation in the development of synchronous sporadic colorectal carcinomas. *Dis. Colon Rectum*. 45(5):674–80
 137. Nosho K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, et al. 2009. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology*. 137(5):1609–20.e1–3
 138. Nosho K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, et al. 2010. Nih public access. . 137(5):1–23
 139. Nygren AOH. 2005. Methylation-specific mlp (ms-mlp): simultaneous detection of cpg methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res*. 33(14):e128–e128
-
140. O'Brien MJ, Winawer SJ, Zauber AG, Gottlieb LS, Sternberg SS, et al. 1990. The national polyp study. patient and polyp characteristics associated with high-grade dysplasia in colorectal adenomas. *Gastroenterology*. 98(2):371–79
 141. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. 2004. Colon cancer survival rates with the new american joint committee on cancer sixth edition staging. *J. Natl. Cancer Inst*. 96(19):1420–25
 142. Ogino S, Brahmandam M, Kawasaki T, Kirkner GJ, Loda M, Fuchs CS. 2006. Epigenetic profiling of synchronous colorectal neoplasias by quantitative dna methylation analysis. *Mod. Pathol*. 19(8):1083–90
 143. Ogino S, Goel A. 2008. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J. Mol. Diagn*. 10(1):13–27

144. Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M, Fuchs CS. 2007. Evaluation of markers for cpg island methylator phenotype (cimp) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J. Mol. Diagn.* 9(3):305–14
145. Otani T, Iwasaki M, Yamamoto S, Sobue T, Hanaoka T, et al. 2003. Alcohol consumption, smoking, and subsequent risk of colorectal cancer in middle-aged and elderly japanese men and women: japan public health center-based prospective study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12(12):1492–1500
146. Oya M, Takahashi S, Okuyama T, Yamaguchi M, Ueda Y. 2003. Synchronous colorectal carcinoma: clinico-pathological features and prognosis. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 33(1):38–43

P

147. Palles C, Cazier J-B, Howarth KM, Domingo E, Jones AM, et al. 2013. Germline mutations affecting the proofreading domains of pole and pold1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.* 45(2):136–44
148. Pande M, Lynch PM, Hopper JL, Jenkins MA, Gallinger S, et al. 2010. Smoking and colorectal cancer in lynch syndrome: results from the colon cancer family registry and the university of texas m.d. anderson cancer center. *Clin. Cancer Res.* 16(4):1331–39
149. Papadopoulos V, Michalopoulos A, Basdanis G, Papapolychroniadis K, Paramythiotis D, et al. 2004. Synchronous and metachronous colorectal carcinoma. *Tech. Coloproctol.* 8(SUPPL. 1):s97–100
150. Parry S, Win AK, Parry B, Macrae FA, Gurrin LC, et al. 2011. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery. *Gut.* 60(7):950–57

151. Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Roncucci L, Benatti P, et al. 1999. Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. *Int. J. Cancer*. 81(1):1–5
152. Peltomäki P. 2003. Role of dna mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J. Clin. Oncol*. 21(6):1174–79
153. Perea J, Justo I, Alvaro E, Lomas M, Tasende JD, et al. 2009. Surgical management of hereditary colorectal cancer: surgery based on molecular analysis and family history. *Rev. Esp. Enferm. Dig*. 101(8):536–40
154. Perucho M. 1996. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol. Chem*. 377(11):675–84
155. Peters U, Jiao S, Schumacher FR, Hutter CM, Aragaki AK, et al. 2013. Identification of genetic susceptibility loci for colorectal tumors in a genome-wide meta-analysis. *Gastroenterology*. 144(4):799–807
156. Piñol V, Andreu M, Castells A, Payá A, Bessa X, Jover R. 2004. Synchronous colorectal neoplasms in patients with colorectal cancer: predisposing individual and familial factors. *Dis. Colon Rectum*. 47(7):1192–1200

R

157. Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M. 2008. Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet*. 371(9612):569–78
158. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, et al. 2012. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am. J. Gastroenterol*. 107(9):1315–29; quiz 1314, 1330

159. Rodríguez-Soler M, Pérez-Carbonell L, Guarinos C, Zapater P, Castillejo A, et al. 2013. Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation. *Gastroenterology*. 144(5):926–32.e1; quiz e13–14
160. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo a, Leonart ME, et al. 2011. P16(ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors. *Oncogene*. 30(18):2087–97
161. Rosenberg DW, Yang S, Pleau DC, Greenspan EJ, Stevens RG, et al. 2007. Mutations in braf and kras differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. *Cancer Res*. 67(8):3551–54
162. Rosty C, Hewett DG, Brown IS, Leggett BA, Whitehall VLJ. 2013. Serrated polyps of the large intestine: current understanding of diagnosis, pathogenesis, and clinical management
163. Rubin BP, Skarin AT, Pisick E, Rizk M, Salgia R. 2001. Use of cytokeratins 7 and 20 in determining the origin of metastatic carcinoma of unknown primary, with special emphasis on lung cancer. *Eur. J. Cancer Prev*. 10(1):77–82
164. Rustgi AK. 2007. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 21(20):2525–38

S

165. Samadder NJ, Curtin K, Wong J, Tuohy TMF, Mineau GP, et al. 2014. Epidemiology and familial risk of synchronous and metachronous colorectal cancer: a population-based study in utah. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 12(12):2078–84.e1–2

166. Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, et al. 2005. Evaluation of a large, population-based sample supports a cpg island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology*. 129(3):837–45
167. Sánchez MJ, Payer T, De Angelis R, Larrañaga N, Capocaccia R, Martinez C. 2010. Cancer incidence and mortality in Spain: estimates and projections for the period 1981-2012. *Ann. Oncol.* 21 Suppl 3:iii30–36
168. Sartore-Bianchi A, Di Nicolantonio F, Nichelatti M, Molinari F, De Dosso S, et al. 2009. Multi-determinants analysis of molecular alterations for predicting clinical benefit to egfr-targeted monoclonal antibodies in colorectal cancer. *PLoS One*. 4(10):e7287
169. Schatzkin A, Lanza E, Corle D, Lance P, Iber F, et al. 2000. Lack of effect of a low-fat, high-fiber diet on the recurrence of colorectal adenomas. polyp prevention trial study group. *N. Engl. J. Med.* 342(16):1149–55
170. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, et al. 2012. Esmo consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann. Oncol.* 23(10):2479–2516
171. Sereno M, Merino M, López-Gómez M, Gómez-Raposo C, Zambrana Tébar F, et al. 2014. Myh polyposis syndrome: clinical findings, genetics issues and management. *Clin. Transl. Oncol.* 16(8):675–79
172. Shaikat A, Scouras N, Schünemann HJ. 2005. Role of supplemental calcium in the recurrence of colorectal adenomas: a metaanalysis of randomized controlled trials. *Am. J. Gastroenterol.* 100(2):390–94
173. Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 274(5293):1672–77

174. Silver A, Sengupta N, Propper D, Wilson P, Hagemann T, et al. 2012. A distinct dna methylation profile associated with microsatellite and chromosomal stable sporadic colorectal cancers. *Int. J. Cancer*. 130(5):1082–92
175. Slattery ML, Curtin K, Wolff RK, Boucher KM, Sweeney C, et al. 2009. A comparison of colon and rectal somatic dna alterations. *Dis. Colon Rectum*. 52(7):1304–11
176. Snover DC. 2011. Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum. Pathol*. 42(1):1–10
177. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. 2005. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept
178. Spirio LN, Samowitz W, Robertson J, Robertson M, Burt RW, et al. 1998. Alleles of apc modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nat. Genet*. 20(4):385–88
179. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, Hamilton SR, Kalady MF, et al. 2014. Hereditary colorectal cancer syndromes: american society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: european society for medical oncology clinical practice guidelines. *J. Clin. Oncol*.

T

180. Takeichi M. 1995. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell Biol*. 7(5):619–27
181. Tang R, Changchien CR, Wu M-C, Fan C-W, Liu K-W, et al. 2004. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability--an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 25(5):841–46

182. The paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: november 30 to december 1, 2002. 2003. *Gastrointest. Endosc.* 58(6 Suppl):S3–43
183. Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G, Nesland JM. 2003. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am. J. Surg. Pathol.* 27(1):65–81
184. Toyota M, Ho C, Ohe-Toyota M, Baylin SB, Issa JP. 1999. Inactivation of cacna1g, a t-type calcium channel gene, by aberrant methylation of its 5' cpg island in human tumors. *Cancer Res.* 59(18):4535–41
185. Tsang AH-F, Cheng K-H, Wong AS-P, Ng SS-M, Ma BB-Y, et al. 2014. Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World J. Gastroenterol.* 20(14):3847–57

V

186. Vaiopoulos AG, Kostakis ID, Koutsilieris M, Papavassiliou AG. 2012. Colorectal cancer stem cells. *Stem Cells.* 30(3):363–71
187. Valastyan S, Weinberg R a. 2011. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 147(2):275–92
188. Valle L, Perea J, Carbonell P, Fernandez V, Dotor AM, et al. 2007. Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam i-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status. *J. Clin. Oncol.* 25(7):781–86
189. Van Assche G, Dignass A, Reinisch W, van der Woude CJ, Sturm A, et al. 2010. The second european evidence-based consensus on the diagnosis and management of crohn's disease: special situations. *J. Crohns. Colitis.* 4(1):28–62

190. Van de Velde CJH, Boelens PG, Borrás JM, Coebergh J-W, Cervantes A, et al. 2014. EURECCA colorectal: multidisciplinary management: European consensus conference colon & rectum. *Eur. J. Cancer*. 50(1):1.e1–1.e34
191. Van Engeland M, Derks S, Smits KM, Meijer GA, Herman JG. 2011. Colorectal cancer epigenetics: complex simplicity. *J. Clin. Oncol.* 29(10):1382–91
192. Van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B. 2002. Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 51(6):797–802

W

193. Wactawski-Wende J, Kotchen JM, Anderson GL, Assaf AR, Brunner RL, et al. 2006. Calcium plus vitamin D supplementation and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 354(7):684–96
194. Wallace K, Grau M V, Ahnen D, Snover DC, Robertson DJ, et al. 2009. The association of lifestyle and dietary factors with the risk for serrated polyps of the colorectum. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 18(8):2310–17
195. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. 2009. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 9(7):489–99
196. Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, et al. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat. Genet.* 38(7):787–93

197. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, et al. 1998. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 339(8):511–18
198. Williams AR, Balasooriya BA, Day DW. 1982. Polyps and cancer of the large bowel: a necropsy study in liverpool. *Gut.* 23(10):835–42
199. Win AK, Macinnis RJ, Dowty JG, Jenkins MA. 2013. Criteria and prediction models for mismatch repair gene mutations: a review. *J. Med. Genet.* 50(12):785–93
200. Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, et al. 1993. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. the national polyp study workgroup. *N. Engl. J. Med.* 328(13):901–6
201. Wong SCC, Lo ESF, Chan AKC, Lee KC, Hsiao WL. 2003. Nuclear beta catenin as a potential prognostic and diagnostic marker in patients with colorectal cancer from hong kong. *J. Clin. Pathol. - Mol. Pathol.* 56(6):347–52
202. Worthley DL, Whitehall VLJ, Buttenshaw RL, Irahara N, Greco SA, et al. 2010. Dna methylation within the normal colorectal mucosa is associated with pathway-specific predisposition to cancer. *Oncogene.* 29(11):1653–62



203. Xie J, Itzkowitz SH. 2008. Cancer in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14(3):378–89
204. Xing X, Cai W, Shi H, Wang Y, Li M, et al. 2013. The prognostic value of cdkn2a hypermethylation in colorectal cancer: a meta-analysis. *Br. J. Cancer.* 108(12):2542–48

205. Xu H, el-Gewely MR. 2001. P53-responsive genes and the potential for cancer diagnostics and therapeutics development. *Biotechnol. Annu. Rev.* 7:131–64

Y

206. Yamauchi M, Morikawa T, Kuchiba A, Imamura Y, Qian ZR, et al. 2012. Assessment of colorectal cancer molecular features along bowel subsites challenges the conception of distinct dichotomy of proximal versus distal colorectum. *Gut.* 61(6):847–54
207. Yasuhara R, Yuasa T, Williams JA, Byers SW, Shah S, et al. 2010. Wnt/beta-catenin and retinoic acid receptor signaling pathways interact to regulate chondrocyte function and matrix turnover. *J. Biol. Chem.* 285(1):317–27
208. Yeoman A, Young J, Arnold J, Jass J, Parry S. 2007. Hyperplastic polyposis in the new zealand population: a condition associated with increased colorectal cancer risk and european ancestry. *N. Z. Med. J.* 120(1266):U2827
209. Young J, Jenkins M, Parry S, Young B, Nancarrow D, et al. 2007. Serrated pathway colorectal cancer in the population: genetic consideration. *Gut.* 56(10):1453–59
210. Yuhara H, Steinmaus C, Cohen SE, Corley DA, Tei Y, Buffler PA. 2011. Is diabetes mellitus an independent risk factor for colon cancer and rectal cancer? *Am. J. Gastroenterol.* 106(11):1911–21; quiz 1922

Z

211. Zauber P, Huang J, Sabbath-Solitare M, Marotta S. 2013. Similarities of molecular genetic changes in synchronous and metachronous colorectal

cancers are limited and related to the cancers' proximities to each other. *J. Mol. Diagn.* 15(5):652–60

8. ANEXOS

ANEXO-1

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA EL USO DE EXCEDENTES DE TEJIDO O SANGRE CON FINES DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

Finalidad y descripción del proceso:

Este documento tiene como objeto solicitar su autorización escrita para la donación gratuita de parte de la muestra sobrante de tejido o sangre que le van a extraer, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica relacionada con el cáncer. Es importante que lea detenidamente esta hoja de consentimiento informado, que entienda su contenido y el objeto de la misma y que, en su caso, haga todas las preguntas que crea preciso acerca de la misma.

La principal vía de obtener dichos tejidos o sangre que permitan la investigación biomédica son las muestras sobrantes de las extracciones que se hacen con fines diagnósticos. Parte de la muestra de tejido o sangre no es necesaria para el correspondiente estudio y para establecer un diagnóstico y por ello, es normalmente destruida.

Usted como paciente puede donar el sobrante de su muestra para que, en lugar de ser destruido, pueda ser utilizado en investigación biomédica relacionada con el cáncer. La finalidad de la donación es dotar a los investigadores de tejido o sangre para que puedan desarrollar avances en el terreno del conocimiento sobre el cáncer, en particular sobre su aparición, evolución y tratamiento.

El consentimiento que ahora presta no supone para usted ningún riesgo o molestia adicional ya que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes de tejido o sangre, que de otra forma se desecharían. Para la obtención de este material, no se llevará a cabo ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra de tejido o sangre para su estudio.

La donación de este sobrante de tejido/ sangre es voluntaria por lo que, si Ud. da el consentimiento para su uso, en cualquier momento puede revocarlo. En caso de producirse esta revocación ello no supondrá ningún cambio en la relación con su médico ni perjuicio alguno en su diagnóstico /tratamiento y/o seguimiento. En caso de revocación su muestra dejará de formar parte de la investigación aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarán parte de la misma.

Carácter altruista de la donación:

La donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro ningún beneficio económico por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciable. Tampoco obtendrá ningún otro beneficio directo como resultado de su participación en este estudio. Sin embargo, los conocimientos obtenidos gracias a los estudios llevados a cabo a partir de su muestra y de muchas otras pueden ayudar al avance médico y, por ello, a otras personas.

La titularidad de la muestra incorporada y de los resultados de la investigación corresponderá al Hospital 12 de Octubre y, en su caso, al investigador. Las muestras podrán ser cedidas a otros grupos de investigación bajo acuerdos de colaboración y siempre para la investigación biomédica del cáncer.

Protección de datos y confidencialidad

Los datos personales que se recojan sobre Usted, serán confidenciales y procesados de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal y la legislación sanitaria y relativa a la investigación biomédica vigente, tratándose los mismos únicamente de acuerdo con los objetivos en el presente comunicado descritos, por lo que cualquier relación entre la muestra y su identidad personal tienen carácter estrictamente confidencial. Asimismo, se informa que los resultados obtenidos de los diferentes estudios llevados a cabo con las muestras, pueden ser publicados en revistas científicas, sin embargo, nunca será facilitada su identidad o datos que le identifiquen o puedan llegar a identificarle.

En el momento que usted consienta el uso de excedente de muestra para los fines de investigación aplicada descrito, dicho excedente (incluyendo terapias experimentales) será sometido a un proceso de disociación. Es decir, sólo será identificado por un número y/o un código constando todos sus datos debidamente codificados, por lo que los investigadores implicados nunca conocerán su identidad o dato alguno que pudiera llegar a identificarle; sin embargo, los mismos, sí podrán en todo caso acceder a otros datos como su sexo o edad, pero siempre manteniendo la debida confidencialidad conforme a la legislación vigente.

De igual modo, sus datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999 de Protección de Datos de Carácter Personal, con la finalidad de gestionar el uso del excedente cedido por usted para los fines de investigación descrito en el presente comunicado, pudiendo ejercer en cualquier momento, los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal.

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo.

Información sobre resultados del estudio

Los datos que se obtengan del análisis de la muestra serán archivados, y formarán parte del estudio / proyecto de investigación manteniéndose durante el desarrollo del mismo. Los métodos utilizados en investigación Biomédica suelen ser diferentes de los aprobados para la práctica clínica, por lo que no deben de ser considerados con valor clínico para Ud.

Sin embargo, en el caso que estas investigaciones proporcionen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para Ud e interesar a su salud o a la de su familia, le serán comunicados si así Ud lo estima oportuno. Un facultativo del Hospital 12 de Octubre se compromete a ofrecerle consejo genético, una vez obtenidos y evaluados los resultados del estudio.

Asimismo, podría obtenerse información relevante para su familia, le corresponderá a Ud decidir si quiere o no comunicárselo. Si Ud. quiere que se le comunique dicha información relevante debe consignarlo en la casilla que aparece al final de esta hoja.

La muestra formará parte de un banco de muestras o tumores hasta su uso en el proyecto de investigación pudiendo ser cedida a otros investigadores, los que a su vez podrán realizar ensayos relacionados con la finalidad para la que Ud haya donado la muestra. Estos investigadores no tendrán en ningún momento, como ya se ha indicado anteriormente, acceso a su identidad.

Le Agradecemos su desinteresada colaboración con el avance de la ciencia y la medicina y, de forma especial, en referencia a la investigación sobre la aparición, desarrollo y tratamiento del cáncer.

DATOS DEL PACIENTE	
<i>Apellidos</i>	
<i>Nombre</i>	
<i>Dirección</i>	
DNI	Nº historia clínica
<i>Autoriza la comunicación de la información relevante derivada de la investigación</i>	SÍ <input type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
<i>Firma</i>	<i>Fecha</i>
<i>Manifiesto que he recibido la información que me ha sido proporcionada sobre el procedimiento anteriormente indicado y he podido formular las preguntas que he considerado oportunas</i>	

CONSENTIMIENTO INFORMADO

D.N.I. del paciente: _____

Fecha: ____/____/____

Nombre del Médico que informa: _____

Nº Colegiado: _____

UNIDAD DE CÁNCER FAMILIAR. ESTUDIO DE FACTORES GENÉTICOS PREDISPONENTES A CÁNCER DE COLON NO ASOCIADO A POLIPOSIS (CÁNCER DE COLON HEREDITARIO NO POLIPÓSICO)

En la mayoría de las ocasiones el cáncer de colon se presenta con carácter esporádico. Existen algunas familias en las que se observa que el número de casos es superior a lo que cabría esperar en la población general, sin que ello se acompañe de poliposis intestinal y acompañados de una elevada incidencia de tumores como el de estómago, vías biliares, endometrio u ovario entre otros. Estudios recientes han puesto de manifiesto que algunas de estas familias presentan mutaciones en alguno de sus genes que son los responsables de este hecho.

Estas mutaciones se transmiten de padres a hijos, igual que se transmiten otros caracteres físicos (como, por ejemplo, el color del pelo) y su presencia supone un aumento del riesgo de desarrollar a lo largo de la vida un cáncer de colon, recto, endometrio y en menor medida de otros tumores como los mencionados anteriormente.

La presencia de una de las mutaciones citadas en una persona no significa que se tenga la certeza absoluta de que este individuo vaya a desarrollar este tipo de tumor, únicamente indica que existe un riesgo mayor al de la población general.

Por el contrario, la ausencia de dicha mutación no puede garantizar la no aparición del cáncer, puesto que es posible que existan otras mutaciones hoy en día desconocidas y que por lo tanto no pueden ser estudiadas o simplemente que no hayan sido detectadas y por otro lado siempre persiste el riesgo de desarrollar un cáncer de forma esporádica (no hereditario).

Su caso ha sido valorado por una Unidad de Consejo Genético en Cáncer Familiar que, a la vista de sus antecedentes familiares, ha considerado la posibilidad de proceder a un estudio molecular con el fin de determinar si posee alguna alteración genética de las que hoy en día conocemos como responsables del "Síndrome de Cáncer de Colon Hereditario no Polipósico".

El análisis se realiza sobre una muestra de sangre extraída a tal efecto una vez otorgado el consentimiento, valorándose de forma exclusiva factores genéticos relacionados con este síndrome sin que pueda ser utilizada para otros fines ni para estudiar otros aspectos que no sean los relacionados con este tipo de tumores. En ocasiones y previo al estudio de mutaciones en sangre debe procederse a un estudio del tejido tumoral para lo cual puede ser preciso solicitar muestras de tejido al servicio de Anatomía patológica correspondiente.

La información sobre los resultados es estrictamente confidencial y únicamente será facilitada a la persona estudiada y a quienes ella nos autorice por escrito. Estos datos quedarán bajo la custodia de la Unidad de Consejo Genético que le atienda, sin que consten en su historial clínico y no podrán ser cedidos a ninguna entidad o persona sin su autorización expresa. Los datos podrán ser utilizados con el fin de realizar estudios epidemiológicos, garantizando en todo momento el anonimato. Si, no obstante lo anteriormente expuesto, en algún momento usted decide que esta información sea destruida, podrá solicitarlo por escrito a la persona responsable de la Unidad que le ha estudiado.

Si su análisis genético es negativo, es decir, no se encuentra ningún tipo de mutación que suponga especial predisposición al cáncer, se le indicarán cuáles son las medidas de prevención a tomar y que dependerán de la existencia o no de casos de portadores de la mutación conocidos en su familia.

Si su análisis genético es positivo se le informará sobre el riesgo existente, así como de las alternativas de prevención disponibles en la actualidad.

En ocasiones se puede obtener un resultado que denominamos no informativo. Este tipo de resultados implica que no se conoce en la actualidad las repercusiones que ciertas alteraciones detectadas puede tener sobre el riesgo de padecer cáncer de colon.

Cuando la existencia de la mutación en la familia ha sido confirmada, debe saber que otros miembros de su familia pueden haberla heredado; de usted (en caso de sus descendientes) o de sus antepasados (en caso de otros familiares como tíos o primos). La Unidad de Consejo Genético en ningún caso contactará con ellos por propia iniciativa para advertirles de esta circunstancia, ya que esta información es estrictamente confidencial. Es decisión personal suya informar a dichos familiares con el fin de que, si ellos lo desean, puedan ser estudiados y valorar así cuál es su riesgo individual con respecto a estos tumores.

De igual manera debe conocer que este tipo de pruebas pueden repercutir en su estado emocional y/o psicológico, tanto positiva como negativamente.

Si usted decide que no desea realizarse un estudio genético, sepa que su decisión será respetada en todo momento y recibirá el asesoramiento genético apropiado a su caso. De igual manera debe saber que existen modelos teóricos que permiten conocer de manera aproximada su riesgo de padecer determinados tipos de cáncer, los cuales podrían aplicársele si no desea realizarse este tipo de test.

Comentarios del médico que informa: _____

AUTORIZACIÓN

Yo, _____, he sido informado oralmente y por escrito sobre las características, beneficios y problemas que plantea el estudio genético en el cáncer.

He comprendido esta información y cualquier duda surgida me ha sido aclarada por el médico.

Por lo anterior **OTORGO MI CONSENTIMIENTO** para que se proceda al estudio de factores genéticos predisponentes al cáncer sobre una muestra de sangre que me será extraída a tal efecto y análisis de tejido tumoral si ello fuera necesario.

Firma:
Fecha:

Firma tutor (caso de menor o incapacitado legalmente)
Fecha:

Firma Médico
Fecha:

Autorizo para que las personas abajo indicadas puedan ser informadas sobre los resultados del estudio realizado.

Nombre _____	TF _____
Nombre _____	TF _____
Nombre _____	TF _____
Nombre _____	TF _____

Fdo.: D. /D^a

Fecha:

REVOCACIÓN

En ejercicio del derecho que tengo de anular el consentimiento prestado manifiesto mi voluntad de revocarlo y solicito se proceda a la destrucción de las muestras sanguíneas extraídas y de la información de ellas obtenida.

Firma:

Fecha:

